IMMUNHISTOCHEMISCHE DIFFERENZIERUNG DERMALER INFILTRATE

Ulf Detmar

Diss.
München
1984

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c. O. Braun-Falco

IMMUNHISTOCHEMISCHE DIFFERENZIERUNG DERMALER INFILTRATE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulf Detmar
aus Mindelheim

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Burg
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.med.Dr.h.c. O.Braun-Falco
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.06.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS:

I.	EINLEITUNG	1
1.	Problematik	1
2.	Theoretische Grundlagen	2
2.1.	Zelldifferenzierung	2
2.2.	Immunperoxidasetechnik	5
2.3.	Immunenzymatische Doppelfärbung	8
2.4.	Ziel der vorliegenden Arbeit	9
II.	MATERIAL UND METHODEN	10
1.	Untersuchungsmaterial	10
2.	Peroxidase - Antiperoxidase Technik (PAP)	11
2.1.	Reagenzien	11
2.2.	Vorbehandlung des Materials	13
2.3.	Reaktionsablauf der PAP Technik	13
2.4.	Kontrollen	15
3.	Immunenzymatische Doppelfärbung	15
3.1.	Reagenzien	15
3.2.	Reaktionsablauf	17
III.	ERGEBNISSE	19
1.	Intrazytoplasmatische Antigendarstellung	19
2.	Lymphome niedrigen Malignitätsgrades	21
3.	Lymphome hohen Malignitätsgrades	30
4.	Pseudolymphome	32
5.	Tumoren der histiozytären Reihe	33
6.	Entzündliche Infiltrate	34
7.	Infiltrate bei verschiedenen Dermatosen	39

IV. DISKUSSION 41

1. Die einfache Immunperoxidase-Methode 41
1.1. Vorteile der PAP Technik 41
1.2. Hintergrundfärbung und Möglichkeiten zu ihrer Verringerung 42
1.3. Fixierung und Spezifität 45
1.4. Austitrierung der Antikörper 46
1.5. Unspezifische Serumabsorption 46
1.6. Spezifische Marker zum Nachweis exogenen Proteins 48
2. Indirekte Doppelfärbung von kappa und lambda 50
2.1. Technik 50
2.2. Vorteile der Doppelfärbung 51
2.3. Vergleich der verwendeten indirekten Doppelfärbung mit der "unlabeled antibody enzyme" Technik nach Mason 51
3. Proliferative und entzündliche Infiltrate 53
3.1. Maligne Non-Hodgkin-Lymphome 53
3.2. Tumoren der histiozytären Reihe 56
3.3. Entzündliche Infiltrate 59

V. ZUSAMMENFASSUNG 62

VI. LITERATURVERZEICHNIS 64

Abkürzungen

NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
Ig	Immunglobulin
POX	Peroxidase
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
ALP	alkalische Phosphatase
κ	kappa - Kette
λ	lambda - Kette
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung

I. EINLEITUNG

1. Problematik

Dermale Infiltrate aus der lymphatischen und histiozytären Reihe verursachen bei der histologischen Beurteilung oft erhebliche Probleme. Die Tatsache, daß sich von eng benachbarten Stufen der Zelldifferenzierungsreihe Neubildungen ableiten lassen, wie dies für die Non-Hodgkin-Lymphome der Fall ist, führt zu großen morphologischen Ähnlichkeiten. Auf der anderen Seite ist die sichere Erkennung verschiedener Zelltypen, ihres Funktionszustandes und ihrer Dignität für Diagnostik und Prognose von entscheidender Bedeutung. Es stehen heute (12) mehrere Methoden zur Verfügung, um die licht- oder elektronenmikroskopisch gewonnenen, morphologischen Beobachtungen durch funktionelle Untersuchungen zu ergänzen. Neben zytochemischen Verfahren, in denen Zellenzyme durch bestimmte Substratreaktionen nachgewiesen werden, ist dies vor allem der Bereich der Immunzytochemie. Mittels markierter Antikörper können sowohl Membranrezeptoren wie auch intrazelluläre Substanzen dargestellt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Identifizierung von Immunglobulin bildenden und histiozytären Zellen in entzündlichen und proliferativen Infiltraten der Haut.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Zelldifferenzierung

Immunglobuline sind Glykoproteine, die aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten aufgebaut sind. Diese vier Polypeptidketten werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden.
Die schweren Ketten lassen sich in fünf strukturell verschiedene Klassen unterteilen (IgG, M, A, D, E), die jeweils mit einer der beiden Leichtkettentypen kappa oder lambda kombiniert sind.
L und H-Ketten besitzen jeweils einen konstanten und einen variablen Bereich. Letzterer ist mit seiner veränderlichen Aminosäurensequenz für die jeweilige Antikörperspezifität verantwortlich.
Jede Immunglobulin produzierende Zelle ist nur in der Lage, Antikörper einer bestimmten Klasse und eines bestimmten L-Kettentyps herzustellen; somit sind in einer Zelle nur kappa oder lambda Ketten nachweisbar. Zellklone, die in diesem Merkmal übereinstimmen, werden als monoklonal bezeichnet, d.h. sie stammen von einer gemeinsamen Stammzelle ab. Zellen, die zwar benachbart liegen, aber verschiedene L-Ketten produzieren, sind dementsprechend polyklonal.
Die Differenzierung zwischen Zellen des lymphatischen und des mononukleären Systems, sowie die Untergliederung der Lymphozytenpopulationen war lange Zeit problematisch. Erst mit der Anwendung enzymzytochemischer und immunologischer Methoden ergaben sich neue Kriterien (14,36,37,38,40,62),

die eine weitergehene Differenzierung ermöglichen (Tab. 1). So ist beispielsweise der Nachweis von unspezifischer Esterase und saurer Phosphatase im Zytoplasma charakteristisch für den histiozytischen Ursprung einer Zelle (11,34). Zur Differenzierung von B und T-Lymphozyten werden heute vorwiegend immunologische Testmethoden verwendet. Die wichtigsten sind die spontane Rosettenbildung mit Schaferythrozyten bei T-Lymphozyten und der Nachweis der C_3- und Fc-Rezeptoren bei B-Lymphozyten (12). Dieser Wandel von einer rein morphologischen Betrachtungsweise zu einer mehr funktionell orientierten war auch für die Schaffung einer neuen Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bedeutsam. Die alte auf morphologischen Kriterien beruhende Klassifikation nach Rappaport (57) wurde durch funktionell ausgerichtete wie z.B. die Kieler Klassifikation der NHL (4) ersetzt. Diese wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tab. 2).

Der Nachweis intrazellulärer Immunglobulinbildung bietet die Möglichkeit, bestimmte Differenzierungsstufen der B-Reihe wie lymphoplasmozytoide Zellen und Plasmazellen isoliert darzustellen. Der quantitative Immunglobulinnachweis nach Stein (61) ist ein Verfahren, bei dem die Immunglobuline aus einem homogenisierten Gewebeextrakt isoliert und die Konzentrationen der einzelnen Immunglobulinklassen mittels der radialen Immunodiffusion gemessen werden. Eine morphologische Zuordnung der Ergebnisse erlaubt diese Technik allerdings nicht. Nur die Verwendung markierter Antikörper am histologischen Schnitt gibt Auskunft über die Verteilung Immunglobulin bildender Zellen und die intrazytoplasmatische Lokalisation von Immunglobulin. Seit langem bekannt (23,71), ist die Immunfluoreszenz:

Tabelle 1: Entwicklung der lymphatischen und mono-histiozytären Zellreihe

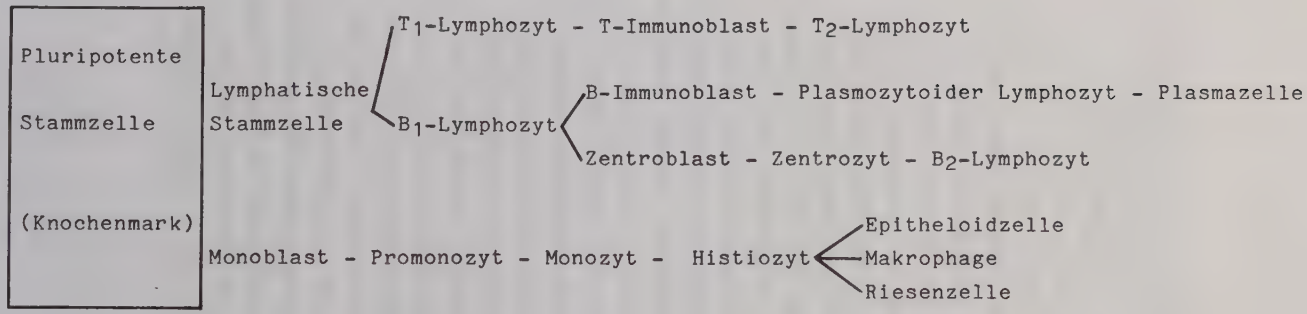


Tabelle 2: Kiel-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

I. Lymphome niedrigen Malignitätsgrades
   1. lymphozytisch
      Cll
      Prolymphozytenleukämie
      Haarzellenleukämie
      Mykosis fungoides
      T-Zonen-Lymphom
   2. lymphoplasmozytoid (Immunozytom)
   3. plasmozytisch
   4. zentrozytisch
   5. zentroblastisch-zentrozytisch

II. Lymphome hohen Malignitätsgrades
   1. zentroblastisch
   2. lymphoblastisch
      a) Burkitt-Typ
      b) convoluted cell type
      c) unklassifiziert
   3. immunoblastisch

Der zur Markierung dienende, fluoreszierende Stoff wird in einer Weise an den Antikörper gekoppelt, daß dessen immunologische Eigenschaften möglichst nicht beeinträchtigt werden. Daneben besteht seit geraumer Zeit (1,51,65) die Möglichkeit der Enzymmarkierung von Antikörpern. Die bekannteste immunzytochemische Methode, die mit Enzymmarkierung arbeitet, ist die Immunperoxidasetechnik (5,8,22,26,31,55,68,73). Sie hat mit den Immunfluoreszenzmethoden viele Gemeinsamkeiten; beide sind hochspezifische Nachweisverfahren für zelluläre Antigene. Die Verwendung enzymmarkierter Antikörper in der vorliegenden Arbeit gründet sich auf einige entscheidende Vorteile dieser Technik (69):

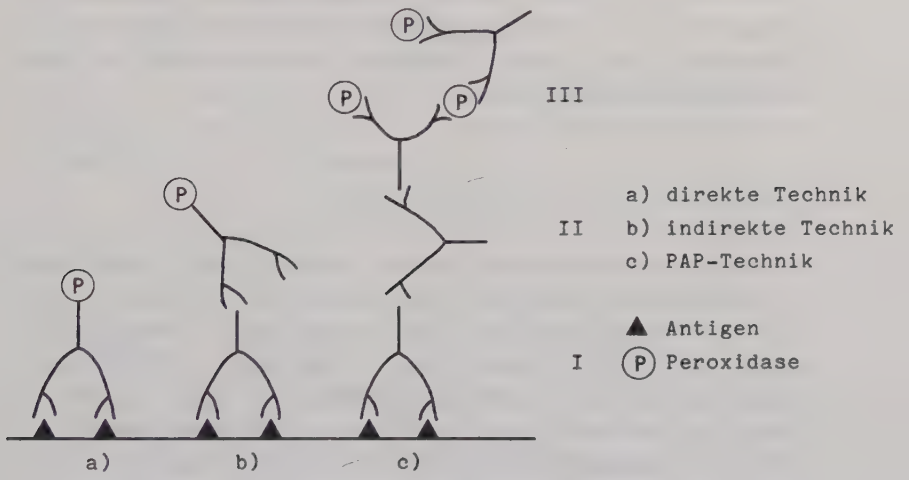
- Immunperoxidase-Präparate sind im Gegensatz zu fluoreszenzmarkierten stabil und die Ergebnisse lichtmikroskopisch auswertbar.
- Die Anwendung am Paraffinschnitt erlaubt nicht nur retrospektive Studien, sie führt auch zu einer wesentlich besseren Erhaltung der Morphologie als die bei der Immunfluoreszenz üblichen Kryostatschnitte.
- Das rotbraune Reaktionsprodukt der Enzymfärbung kann mit einer Gegenfärbung kombiniert werden, was die Zuordnung dargestellter Antigene zu zellulären Strukturen erleichtert.

2.2. Immunperoxidasetechnik

Grundlage aller Immunperoxidasetechniken sind spezifische Antikörper gegen die zu untersuchenden Antigene. Während früher polyklonale Antiseren verwendet wurden, stehen heute monoklonale Antikörper zur Verfügung, die die Empfindlichkeit der Methode weiter erhöhen.

Im Beginn stand die direkte Technik (Abb. 1a), bei der das Enzym kovalent an die Antikörper gebunde wurde (1). Bei der indirekten Technik (Abb. 1 b) wird zuerst ein spezifischer Antikörper gegen das Antigen aufgetragen und in einem zweiten Schritt ein Antikörper-Enzym-Konjugat zugegeben, das gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.
Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß der erste Antikörper zum Nachweis verschiedener Antigene beliebig gewechselt werden kann, während das Konjugat unverändert bleibt.
Die enzymatische Markierung von Antikörpern ist allerdings nicht unproblematisch (69): Die an der Konjugation beteiligten chemischen Reaktionen können zur Denaturierung der Antikörper und zur Inaktivierung der Enzyme führen. Darüber hinaus entstehen außer dem gewünschten Konjugat aus je einem Antikörper und einem Enzymmolekül Aggregate unmarkierter oder teilmarkierter Antikörper, die neben freien Mengen an unkonjugiertem Enzym und unmarkierten Antikörpern vorhanden sind. Hieraus ergeben sich folgende Nachteile: Freie unmarkierte Antikörper hemmen die markierten kompetitiv, was zu einer Herabsetzung der Sensitivität führt. Daneben erhöhen denaturierte Antikörper, freie Enzymmoleküle und die erwähnten Aggregate die unspezifische Hintergrundfärbung. Diese Probleme versuchte Sternberger (64) mit seiner "unlabeled antibody enzyme method" zu umgehen. Bei dieser Methode wird ein Primärantikörper aus Spezies A gegen das untersuchte Antigen in hoher Verdünnung aufgetragen; seine beiden Antigen-Bindungsstellen sind daher in der Regel besetzt. Im zweiten Schritt wir ein intermediärer Antikörper aus Spezies B im Überschuß zugegeben, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers (Spezies A) gerichtet

Abbildung 1: Immunperoxidasetechniken (69)



ist. Die Zugabe im Überschuß führt dazu, daß sich nur ein Bindungsarm des zweiten Antikörpers an den Primärantikörper bindet, während die zweite Bindungsstelle frei bleibt. Im dritten Schritt wird ein in Spezies A gebildeter Antikörper gegen Peroxidase aufgetragen, dessen Fc-Teil durch den freien Arm des intermediären Antikörpers gebunden wird; damit bleiben die spezifischen Peroxidase-Bindungsstellen unbesetzt. Im vierten und letzten Schritt wird das Enzym Peroxidase zugesetzt; es bindet sich an den spezifischen Antikörper und kann in der anschließenden Reaktion mit dem Substrat sichtbar gemacht werden. Eine Abwandlung dieser ursprünglichen "enzyme bridge method" (63) ist die Peroxidase-Antiperoxidase Immunkomplexmethode (PAP) (65), die

empfindlichste Immunperoxidasetechnik, die zur Zeit benutzt wird (Abb. 1 c). Dabei werden die Schritte drei und vier durch die Zugabe eines stabilen PAP-Komplexes ersetzt, der durchschnittlich aus zwei Molekülen Antiperoxidase und drei Molekülen Peroxidase besteht.

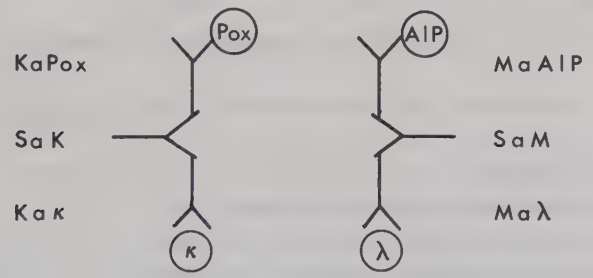
2.3. Immunenzymatische Doppelfärbung

Mit dem Nachweis mehrerer Antigene stellte sich die Frage, ob diese Antigene an ein und derselben oder an verschiedenen Bindungsstellen vorkommen. Die gleichzeitige Darstellung zweier Antigene in einem Schnitt bringt daher entscheidende Vorteile. Die bekannteste Doppelfärbungsmethode ist die Immunfluoreszenzmarkierung mit Rhodamin und Fluoreszein (59). Als immunenzymatische Methode gab es lange Zeit nur das Doppelsubstrat-Peroxidase Verfahren von Nakane (51): Beide Antigene wurden nacheinander mit einer indirekten Immunperoxidasetechnik dargestellt, wobei die Verschiedenfarbigkeit durch einen Substratwechsel der Peroxidase erreicht wurde. Gravierende Nachteile dieser Methode waren unerwünschte Kreuzreaktionen und Zerstörung des Antigens infolge der langen Inkubationszeiten (21).
Die erste wirklich simultane immunenzymatische Doppelfärbetechnik wurde 1978 von Mason und Sammons (43) veröffentlichte; Grundlage ist die "unlabeled antibody enzyme method" von Sternberger (Abb.2): Zwei homolog aufgebaute "Antikörper-Sandwiches" aus verschiedenen Spezies werden gleichzeitig aufgetragen; Enzym der Nachweisreaktion ist in einem Fall Peroxidase mit einem rotbraunen, im anderen Fall alkalische Phosphatase mit einem blauen Reaktionsprodukt.

2.4. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Verwendung enzymmarkierter Antikörper zur Untersuchung dermaler Infiltrate ist noch relativ neu.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Immunperoxidasetechnik zu vervollkommnen sowie eine immunenzymatische Doppelfärbungsmethode aufzubauen.

Abbildung 2



Kaκ = Kaninchen anti κ-Kette
SaK = Schwein anti Kaninchen Ig
KaPox = Kaninchen anti Peroxidase
Maλ = Maus anti λ-Kette
MaAlp = Maus anti alkalische Phosphatase
SaM = Schaf anti Maus Ig
Pox = Peroxidase
AlP = Alkalische Phosphatase

Auf dieser Grundlage wurde die Beteiligung Immunglobulin bildender und histiozytärer Zellen an dermalen Infiltraten verschiedener Genese untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden 90 Hautbiopsien von Patienten mit verschiedensten Dermatosen aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Dabei lag das Schwergewicht auf der Differentialdiagnostik von Non-Hodgkin-Lymphomen. Aus technischen Gründen wie z.B. unspezifische Serumüberlagerung bzw. Fixationsmängel waren 28 Fälle nicht auswertbar.
Tabelle 3 zeigt die Verteilung der übrigen Präparate.

Tabelle 3: Verteilung der untersuchten Dermatosen

NHL niedrigen Malignitätsgrades	
- Chronisch lymphatische Leukämie	2
- Mykosis fungoides	4
- Zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom	1
- Lymphoplasmozytoides Lymphom	7
- Lymphozytisches Lymphom	1
NHL hohen Malignitätsgrades	
- Zentroblastisches Lymphom	3
- Immunoblastisches Lymphom	3
- Lymphoblastisches Lymphom	2
- Undifferenzierbar	2
Pseudolymphome	5
Tumoren der histiozytären Reihe	11

Tabelle 3: Fortsetzung

Entzündliche Infiltrate bei	
- Basaliom	4
- NHL	2
- spinozellulärem Karzinom	1
- Malignem Melanom	1
- Zyste	1
- Unbekannter Genese	4
Entzündliche Infiltrate bei verschiedenen Dermatosen	8

2. Die Peroxidase-Antiperoxidase Technik (PAP):

2.1. Reagenzien

TRIS-Stammlösung: 60,5 g TRIS in 1000 ml physiologischer NaCl-Lösung auflösen; mit technischer HCl auf pH 7,6 einstellen.

TRIS-NaCl: TRIS-Stammlösung 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnen.

Trypsinlösung: 0,1 % Lösung von Trypsin und $CaCl_2$ in Aqua dest. auf pH 7,8 einstellen und im Inkubator auf 37° halten.

Michaelispuffer: Vorratslösung aus 20,6 g 5,5-Diethylbarbitursäure-Natrium in 1000 ml Aqua dest. (= 0,1 m-Veronallösung) gekühlt aufbewahren; vor Gebrauch 3 Teile Veronallösung + 2 Teile 0,1n-HCl mischen, auf pH 7,4 einstellen.

Carbazollösung: 20 mg Cabazol (=3-Amino-9-Ethylcarbazol)
in 12 ml Dimethylsulfoxid auflösen.
+ 100 ml Michaelispuffer (pH 7,4)
+ 10 µl konzentriertes H_2O_2
ad 200 ml mit Aqua dest. auffüllen, mischen.

Seren: Schweine-Normalserum, unverdünnt (Dako).
Antiseren (Dako) mit TRIS-NaCl verdünnt:

Kaninchen anti-human κ	1:600
" anti-human λ	1:300
" anti-human IgG	1:300
" anti-human IgA	1:300
" anti-human IgM	1:500
" anti-human Lysozym	1: 75
" anti-human α_1-Anti-chymotrypsin	1: 75
" anti-human-Albumin	1:100
" anti-human J-chain (Nordic)	1:100
Schwein anti-Kaninchen Ig	1: 20
PAP-Komplex	1: 50

Bezugsquellen: Dako; Denmark (über Boehringer Ingelheim)
Nordic; Tilburg-Niederlande
Sigma Chemie GmbH; München-Taufkirchen

2.2. Vorbehandlung des Materials

Von dem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Material wurden 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt und mindestens 24 Std. bei 30° C luftgetrocknet. Die Schnitte wurden zweimal je 10 min. in reinem Xylol gründlich entparaffiniert; bereits geringe Paraffinreste können die Antigen-Antikörperreaktion behindern. Anschließend wurde restliches Xylol durch 10 minütiges Einbringen in absolutes Methanol entfernt. Zur Blockade der endogenen Peroxidase kamen die Präparate für 20 min. in eine 0,3 % Lösung von H_2O_2 in absolutem Methanol. Im folgenden Waschvorgang mit TRIS-NaCl (3 mal 5 min.) wurden immer frische Lösungen verwendet.
Da die H_2O_2 Lösung nur begrenzt haltbar war, wurde sie alle drei bis vier Tage mit konzentrierter, kühl aufbewahrter H_2O_2 neu angesetzt.
Die Vorbehandlung der Schnitte mit Trypsin wurde nicht routinemäßig durchgeführt. Die Inkubationsdauer in der auf 37° C erwärmten Trypsinlösung wurde für ein bestimmtes Präparat durch Vergleich von Schnitten mit verschiedenen Einwirkungszeiten festgelegt; sie lag zwischen 5 und 15 min. Anschließend wurde die Reaktion durch zweimaliges Wässern (5 min.) in TRIS-NaCl gestoppt.

2.3. Reaktionsablauf der PAP-Technik

Alle folgenden Inkubationen mit Antiseren wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu verhindern; dies würde zu einer Zerstörung der Morphologie führen. Die einzelnen Antiseren wurden mit Glaspipetten auf die feuchten Schnitte auf-

getropft, nachdem die Umgebung der Schnitte mit einem Lappen vorsichtig getrocknet worden war. Dabei ist auf eine gründliche Benetzung zu achten.
Zur Verringerung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurde unverdünntes Schweinenormalserum verwendet. An die 10minütige Inkubation schloß sich kein Waschvorgang an; überschüssiges Serum wurde lediglich abgekippt. Danach wurden die Schnitte 30 min. lang mit verdünnten Kaninchen-Antiseren gegen die nachzuweisenden, menschlichen Antigene (Tab. 4) inkubiert. Die Antikörper wurden in verschieden starken Konzentrationen aufgetragen, die in vorhergehenden Verdünnungsreihen ermittelt worden waren; dies half überstarke Anfärbung zu vermeiden. Nach Waschen in frischer TRIS-NaCl-Lösung zur Entfernung ungebundener Antikörper, erfolgte das Aufbringen des Sekundärantikörpers - Schwein anti-Kaninchenimmunglobulin - in einer Verdünnung von 1:20. An die 30minütige Inkubation schloß sich nach einem weiteren Waschvorgang in TRIS-NaCl die ebensolange Inkubation mit dem PAP-Komplex (1:50) an.
Nicht gebundenes PAP-Serum wurde durch zweimal 5min. Spülen entfernt; danach wurden die Schnitte einige Minuten gewässert. Die Entwicklung der Peroxidasereaktion konnte nach Betropfen der feuchten Präparate mit Carbazollösung unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung verfolgt werden.
Bevor sich das umgebende Bindegewebe zu stark anfärbte, wurde die Reaktion nach 15-25min. durch Eintauchen in Leitungswasser gestoppt.
Die Schnitte wurden nach Einbringen in Aqua dest. 2 min. in Hämalaun gegengefärbt und anschließend mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt.

2.4. Kontrollen

Um falsch positive Ergebnisse zu erkennen wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt:

a) Reaktionsablauf ohne Inkubation mit Primärantikörper, unter Beibehaltung aller übrigen Schritte.

b) Enzymreaktion mit Carbazol ohne vorhergehende Inkubation mit Antikörpern.

Kontrolle a) sollte unspezifische Bindungen des intermediären Antikörpers zu Gewebsantigenen zeigen, während Kontrolle b) auf endogene Peroxidaseaktivität angesprochen hätte. Beide Kontrollen fielen stets negativ aus.

Zur Erkennung falsch negativer Reaktionen wurden bekannte positive Vergleichspräparate (M. Waldenström, Blutausstriche) gefärbt. Diese Tests ergaben eine generelle Funktionsfähigkeit der verwendeten Antikörper.

3. Immunenzymatische Doppelfärbung

3.1. Reagenzien

Zusätzlich zu den Reagenzien der PAP-Technik wurden verwendet:

Fast Blue BB Salt (Sigma)

Naphtol-AS-MX (alkaline solution; Sigma)

Naphtol-AS-MX Puffer: 0,2 ml Dimethyl-Formamid in einem Glasgefäß werden mit 2 ml Naphtol-AS-MX und 9,8 ml 0,1m-TRIS-NaCl gemischt; pH 8,2

AlP-Reaktionslösung: Fast Blue BB Salz wird kurz vor Gebrauch in Naphtol-AS-MX Puffer gelöst (1 mg/ml)

Normales Ziegenserum (Nordic)	1:20
Maus anti-human λ (Bethesda Research Lab.)	1:50
Ziege anti-Kaninchen Peroxidase konjugiert (Sigma)	1:50
Ziege anti-Maus alkalische Phosphatase konjug. (Sigma)	1:50

Alle Antiseren wurden mit TRIS-NaCL verdünnt.

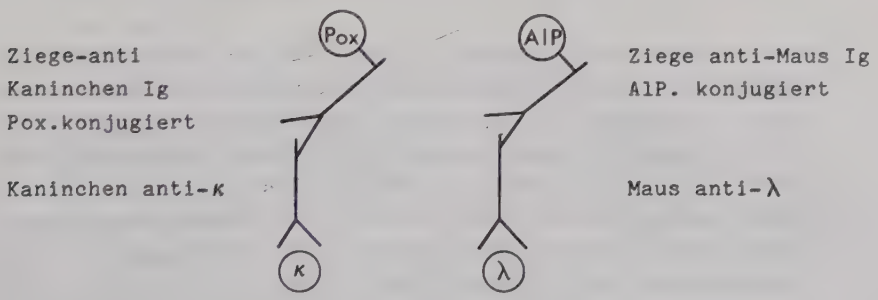
Tabelle 4 Reaktionsablauf der PAP-Technik

1) Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (2 mal 10 min.)
2) 10 min. in absolutem Methanol
3) 20 min. in 0,3 % H_2O_2 in absolutem Methanol
4) 3 mal 5 min in TRIS-NaCl
5) Trypsin-Vorbehandlung (nicht routinemäßig) 5-15 min. danach 2 mal 5 min. in TRIS-NaCl
6) 10 min. Inkubation mit unverdünntem Schweinenormalserum
7) 30 min. Inkubation mit Kaninchen-Antiseren gegen folgende Antigene: kappa, lambda, IgG, IgA, IgM, Lysozym, α_1-Antichymotrypsin, Albumin, J-Kette;
8) 3 mal 5 min. waschen mit TRIS-NaCl
9) 30 min. Inkubation mit Schwein-Antiserum gegen Kaninchen-Ig
10) 3 mal 5 min. waschen mit TRIS-NaCl
11) 30 min. Inkubation mit PAP-Komplex
12) 2 mal 5 min. in TRIS-NaCl, dann in H_2O
13) Mikroskopisch kontrollierte Inkubation in Carbazollösung (15-25 min.)
14) Leitungswasser-Aqua dest.-Hämalaun (2 min.)-Leitungswasser (10 min.)-Aqua dest.-Eindecken in Kaisers Glyzeringelatine

3.2. Reaktionsablauf der Doppelfärbungstechnik

In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Doppelfärbungstechnik entwickelt, die aus zwei enzymmarkierten "Antikörpersandwhiches" besteht: (Abb. 3).

Abbildung 3: Indirekte immunenzymatische Doppelfärbung von kappa und lambda mit Peroxidase und alkalischer Phosphatase



Die Vorbehandlung der histologischen Schnitte erfolgte in gleicher Weise wie bei der PAP-Technik. Zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfärbung wurde eine 10minütige Inkubation mit Ziegennormalserum (1:20) durchgeführt, das danach nur "abgekippt" wurde. Anschließend begann die immunologische Kennzeichnung von kappa und lambda.

Im ersten Schritt wurden Antikörper verschiedener Spezies gegen die beiden nachzuweisenden Antigene aufgetragen (Kaninchen anti-kappa, Maus anti-lambda). Der zweite Schritt bestand aus enzymkonjugierten Antikörpern einer Spezies (Ziege), die jeweils gegen eines der Immunglobuline aus Schritt 1 gerichtet waren (Ziege anti-Maus, Ziege anti-Kaninchen). Beide Antiseren eines Schrittes wurden vorher gemischt und gemeinsam aufgetragen; die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf das Endgemisch.

Zwischen und nach den beiden 30minütigen Inkubationen wurden alle Schnitte gründlich in TRIS-NaCl gewässert.

Die anschließenden Enzymreaktionen erfolgten nacheinander. Zuerst wurde die Peroxidasereaktion mit Carbazollösung entwickelt (rotbraun), nach kurzem Waschvorgang mit TRIS-NaCl dann die alkal. Phosphatasereaktion mit Fast Blue BB Salz (blau). Die Bildung der Reaktionsprodukte wurde in beiden Fällen unter dem Mikroskop verfolgt; die Entwicklungszeiten lagen dabei zwischen 15 und 25 min. Nach Beendigung der Nachweisreaktion durch Einbringen in H_2O, wurden die Schnitte nicht oder nur sehr schwach gegengefärbt (30 sec. mit Hämalaun oder Brillantgrün). Die Eindeckung erfolgte mit Kaisers Glyzeringelatine.

Hinweis: Beide "sandwiches" der Doppelfärbung wurden in Vorversuchen zuerst für sich allein getestet, um optimale Inkubationszeiten und Verdünnungsstufen der Antiseren zu erhalten. Eine Kombination erfolgte erst, als beide Teile eigenständig funktionierten.

Tabelle 5: Reaktionsablauf der Doppelfärbung

1) Entparaffinierung in Xylol (2 mal 10 min.)
2) 10 min. in absolutem Methanol
3) 20 min.in 0,3 % H_2O_2 in absolutem Methanol
4) 3 mal 5 min. in TRIS-NaCl
5) 10 min. Inkubation mit Ziegennormalserum (1:20)
6) 40 min. Inkubation bei Zimmertemperatur mit Maus anti-lambda (1:50) und Kaninchen anti-kappa (1:500)
7) 3 mal 5 min. in TRIS-NaCl
8) 40 min. Inkubation bei Zimmertemperatur mit Ziege anti-Maus (AlP markiert) 1:50 und Ziege anti-Kaninchen (Pox markiert) 1:50
9) 2 mal 5 min., 1 mal 10 min. in TRIS-NaCl
10) Peroxidasereaktion mit Carbazollösung, 20-30 min., wässern
11) AlP-Reaktion mit AlP-Reaktionslösung, 15-30 min.
12) Leitungswasser-Aqua dest.-Einbettung mit Kaisers Glyzeringelatine

III. ERGEBNISSE

1. Intrazytoplasmatische Antigendarstellung

Das formalinfixierte, paraffineingebettete Material wurde mit der PAP-Technik untersucht auf:

- Immunglobuline der Klassen G,A,M (kappa oder lambda-Kette)
- Lysozym und alpha$_1$-Anti-Chymotrypsin, als histiozytäre Marker
- Humanalbumin und J-Kette, bei Verdacht auf unspezifische Färbung.

In folgenden Fällen wurden Doppelfärbungen mittels der indirekten immunenzymatischen Methode durchgeführt:

- Zweifel über die endogene bzw. exogene Herkunft von intrazellulärem Immunglobulin;
- Probleme bei der Beurteilung verschiedener Zellpopulationen hinsichtlich Zellzahl und topographischer Verteilung;

Die Darstellung zellulärer Immunglobuline mit der PAP-Technik ergab drei Hauptformen der Antikörperverteilung (Abb. 4).

Abbildung 4: Verteilungsmuster intrazellulärer Immunglobuline

a) diffus intrazytoplasmatisch

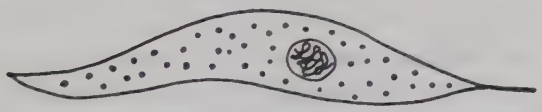
b) Einschlußkörper

c) ringförmig

Die Intensität der Färbung reicht von "schwach" über "mittel" bis "stark" und ließ eine grobe Quantifizierung der Immunglobulinmengen zu; dabei war auf gleiche Inkubationszeiten zu achten, wenn Vergleiche zwischen verschiedenen Versuchsserien gezogen werden sollten.

Beim Nachweis von zellulären Lysozym und alpha$_1$-Antichymotrypsin ergab sich relativ einheitlich ein granuläres Verteilungsmuster im Zytoplasma (Abb. 5).

Abbildung 5: Granuläres Anfärbungsmuster bei Lysozym und Alpha$_1$-Antichymotrypsin Nachweis



Die Zahlenangaben in den folgenden Tabellen verstehen sich als semiquantitativ geschätzte Prozentanteile der positiven Zellen am Gesamtinfiltrat. Die Angabe der Infiltratmenge soll die Einstufung der Aussagekraft des Einzelfalles erleichtern.

2. Lymphome niedrigen Malignitätsgrades

Die T-Lymphome niedrigen Malignitätsgrades zeigten keine intrazytoplasmatische Ig-Bildung. Lediglich in einem Fall von perifollikulärer Mykosis fungoides sind einige wenige Zellen mit schwacher, ringförmiger Färbung für IgG vom kappa und lambda-Typ darstellbar. In drei von vier Fällen reagieren zwischen 5 und 10 % der Infiltratzellen positiv für Lysozym und alpha$_1$-Antichymotrypsin.

Bei den niedrig malignen Lymphomen vom B-Typ zeigten die untersuchten Fälle von chronisch lymphatischer Leukämie keine oder nur sehr geringe (3 %) Ig-Bildung, wobei diese wenigen positiven Zellen mit polyklonalem Muster (IgG, IgA, IgM) im Randbereich des Infiltrates lagen.
Im einzigen vorliegenden Fall eines zentroblastisch-zentrozytischen Lymphoms (Brill-Symmers) finden sich in etwa 50 % der Zellen kleine, intrazytoplasmatische Einschlußkörperchen ausschließlich vom IgG/kappa-Typ. Diese Patientin wies auch klinisch eine deutliche Vermehrung von IgG/kappa im Serum auf. In der Immunelektrophorese waren neben der IgM Linie die Präzipitationslinien für kappa und IgG pathologisch verstärkt; eine Bence-Jones Proteinurie bestand nicht.

In der Gruppe der Immunozytome wurden insgesamt sieben lympho-plasmozytoide Lymphome untersucht. Bei den Patienten ohne klinische Gammopathie konnte die endgültige Diagnose Immunozytom erst durch den Nachweis monoklonaler intrazytoplasmatischer Immunglobuline gesichert werden.
Im einzelnen fanden sich (Tab. 8) viermal IgM/kappa, je einmal IgA/kappa, IgG/kappa, und IgM/lambda. Der prozentuale Anteil Ig-bildender Zellen am Gesamtinfiltrat lag dabei zwischen 10 und 80 %. Bis auf zwei Fälle, die ausschließlich monoklonales Ig produzieren, ist in allen Präparaten eine geringe Zahl polyklonaler Infiltratzellen nachweisbar - überwiegend vomn IgG/lambda Typ - deren Anteil um ca. 1 % liegt.

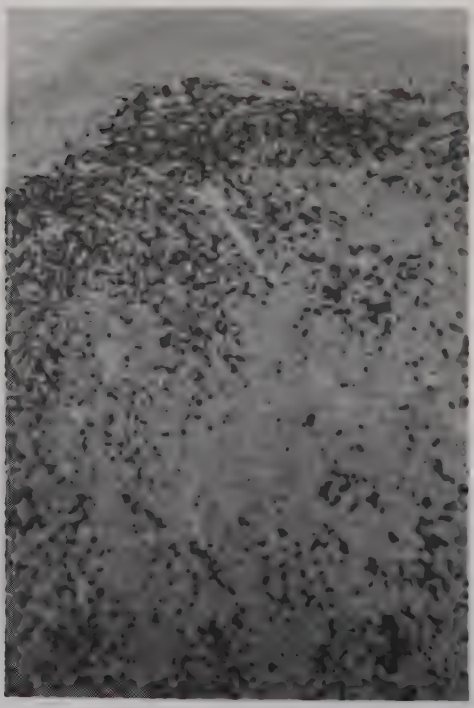
Tabelle 6: Immunzytochemische Charakterisierung von Infiltratzellen bei malignen kutanen T- und B-Zell Lymphomen niedrigen Malignitätsgrades (außer Immunozytome)

Diagnose	Typ	Infiltratmenge *)	Intrazell. Darstellung von: κ	λ	IgA	IgG	IgM	Ly	Ac
MF	T	++	0	0	0	0	0	0	0
MF	T	+	0	0	0	0	0	5	0
MF**	T	++	<1	<1	0	<1	0	0	0
MF**	T	+	0	0	-	-	-	10	10
Cll	B	+	0	0	0	0	0	0	0
Cll	B	+++	2	1	<1	1	2	<1	0
Zb/zz**	B	+++	50	0	0	50	0	0	0
Lz	B	++	0	0	0	0	0	0	0

alle Zahlenangaben in %

* = Skala: 1+ bis 4+
** = Doppelfärbung für kappa und lambda-Ketten
Ly = Lysozym
Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin
MF = Mykosis fungoides
Cll = Chronisch lymphatische Leukämie
Zb/zz = Zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom
Lz = Lymphozytisches Lymphom

Abbildung 6: Kutanes Immunozytom. Nachweis von Kappa - Ketten - Produktion in monoklonalen Tumorzellen.



In einigen Fällen (Abb. 6 u. 7) wurden mittels Doppelfärbung beide leichten Ketten gleichzeitig dargestellt, was die Beurteilung hinsichtlich Zellzahl und Verteilung wesentlich erleichterte.

Vergleicht man die Relationen zwischen Größe der monoklonalen Infiltrate und Anteil der übrigen Ig-bildenden Zellen, so ergibt sich für die leichten Ketten mindestens ein Verhältnis von 10 : 1 (Tab. 7).

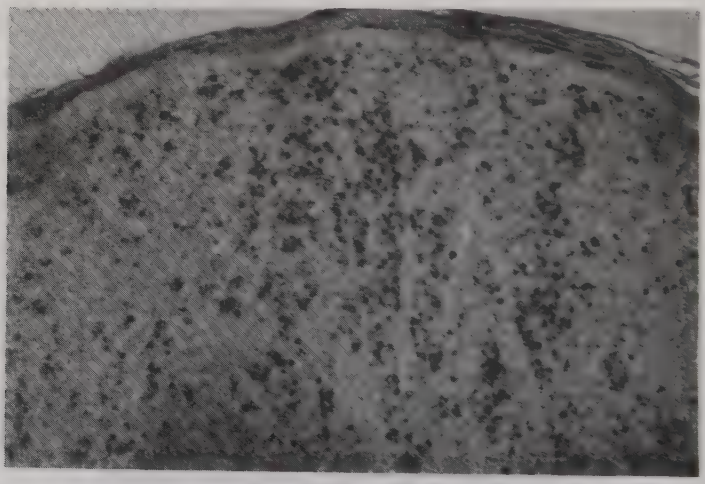
Tabelle 7: Größenvergleich von mono- und polyklonalen Infiltraten bei Immunozytomen

Monoklonal	30	20	10	80	10	50	15	%
Polyklonal	0	1	1	0	1	5	1	%

Bemerkenswert ist, daß es sich in den beiden Fällen ohne Begleitinfiltrat um Immunozytome mit einem relativ hohen Gehalt an Ig-bildenden Tumorzellen handelt (30 und 80 %).

Die Verteilung Ig-bildender Tumorzellen innerhalb der Hautinfiltrate ist unterschiedlich; drei verschiedene Muster lassen sich abgrenzen:

Abbildung 7: Kutanes Immunozytom. Darstellung von lambda Ketten - Produktion in monoklonalen Tumorzellen.



- Randständiges Muster
  Das Präparat besteht aus mehreren zellreichen Follikeln; die Ig-bildenden Tumorzellen liegen in Gruppen vor allem im Randbereich der Follikel (Abb. 8 a).

- Disseminiertes Muster
  Die Ig-bildenden Zellen sind über das gesamte Infiltrat verteilt.

- Nestartiges Muster
  Ig-bildende Tumorzellnester sind über das Infiltrat verstreut (Abb. 8 b).

Abbildung 8: Verteilungsmuster Ig-bildender Tumorzellen

a) randständig b) nestartig

Tabelle 8: Immunenzymatische Charakterisierung von Infiltratzellen bei Immunozytomen+)

Nr.	Infiltrat-menge	Intrazell. kappa	lambda	Darstellung von: IgG	IgA	IgM	Ly	Ac	Verteilungsmuster des CIg
1	+++	0	30	0	0	30	-	0	DI/R
2*	++++	20	1	1	20	1	2	1	R/E
3*	+++	10	1	1	1	10	-	-	DI/R
4	+	80	0	0	0	80	0	0	DI
5*	++	10	1	1	1	10	0	0	DI
6	++	50	5	5	0	50	0	0	DI
7	++++	15	1	15	0	1	3	0	DI/R

\+ alle Zahlenangaben in %
++ Skala: 1+ bis 4+
Ly = Lysozym
Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin
CIg = intrazelluläres Immunglobulin
DI = Diffus intrazytoplasmatisch
R = Ringförmig
E = Einschlußkörperchen
* = Doppelfärbung für kappa und lambda-Ketten

Die Zuordnung der einzelnen Immunozytome zu den Verteilungsmustern ergibt folgendes Bild:

Randständig:	Disseminiert:	Nestartig:
IgM/kappa	IgM/kappa	IgA/kappa
IgM/kappa	IgM/kappa	IgG/kappa
IgM/lambda		

Allen drei Mustern ist eine klonale Anordnung der Ig-bildenden Zellen zu eigen, das heißt gleichtartige Zellen treten gruppiert auf.
Ganz anders sieht die Verteilung der polyklonalen Begleitinfiltrate aus: Sie sind über das gesamte Infiltrat disseminiert und treten nur im Tumorgrenzgebiet und in Gefäßnähe gehäuft auf.
Die histiozytären Marker Lysozym bzw. $Alpha_1$-Antichymotrypsin lassen sich nur bei zwei von sieben Immunozytomen in wenigen Zellen (1 - 3 %) nachweisen, die überwiegend im Infiltatrandbereich liegen.
Die Anhäufung von Ig im Zytoplasma der Tumorzellen ist unterschiedlich stark: Sie reicht von einer leichten, ringförmigen Anfärbung an der Zellmembran bis zu großen, Russelbody ähnlichen Gebilden, die den Kern an die Zellmembran drängen, so daß in einem Fall nahezu das Bild von "Siegelringzellen" entsteht (IgA/kappa).

Insgesamt gesehen sind Immunozytome vom IgM-Typ am häufigsten (5/7). Bei den leichten Ketten steht kappa an erster Stelle (6/7).

3. Lymphome hohen Malignitätsgrades

In dieser Gruppe kamen zehn Fälle zur Untersuchung:
Die zentroblastischen Lymphome beinhalten keine Ig produzierenden Zellen; lediglich Zellen mit exogenem Ig (IgG, IgM/kappa) waren in geringem Ausmaß (1 - 2 %) in einem Fall feststellbar. Histiozytäre Zellelemente waren mittels Lysozym bzw. Alpha$_1$-Antichymotrypsin Färbung in zwei von drei Präparaten disseminiert im Tumorrandbereich und angrenzenden Bindegewebe darzustellen (Tab. 9).

Von den beiden lymphoblastischen Lymphomen enthielt nur eines einen kleinen Prozentsatz polyklonaler Plasmazellen, welche in multizentrischen Nestern an Septen und an den Tumorrändern lagen.

Bei den drei immunmorphologisch untersuchten immunoblastischen Lymphomen ergab sich kein einheitliches Bild:
In einem Fall fand sich nur eine kleine Zahl polyklonaler Zellen, vor allem IgG/kappa und lambda, daneben IgA und IgM. Sie lagen vorwiegend im Randbereich und an Septen, während die Hauptmasse der Tumorzellen kein Ig produzierte. In den beiden anderen Fällen zeigten einmal 1 % und einmal 90 % der Zellen eine schwach positive Membrankonturierung, ausschließlich für die leichte kappa-Kette.

Zwei Lymphome hohen Malignitätsgrades waren unklassifizierbar; es fand sich keinerlei Ig-Bildung und nur in einem Präparat eine geringe histiozytäre Begleitreaktion am Infiltratgrund.

Tabelle 9: Immunzytochemische Charakterisierung von Infiltratzellen bei Lymphomen hohen Malignitätsgrades

Nr.	Typ	Infiltratmenge 1+ bis 4+	Intrazell. Darstellung von kappa	lambda	IgG	IgA	IgM	Ly	Ac
1	zb	+++	0	0	0	0	0	0	1
2*	zb	++	1	1	2	0	1	0	3
3*	zb	+++	0	0	0	0	0	0	0
4	ib	++++	1	1	2	1	1	1	1
5	ib	+++	1	0	0	0	0	0	0
6*	ib	+++	90	0	0	0	0	1	1
7	lb	+++	0	0	-	-	-	-	0
8	lb	++++	5	5	5	5	1	-	0
9	undiff.	+++	0	0	0	0	0	1	3
10	undiff.	+++	0	0	0	0	0	0	0

Ly = Lysozym
Ac = $Alpha_1$-Antichymotrypsin
* = Doppelfärbung für kappa- und lambda-Ketten
zb = zentroblastisches Lymphom
ib = immunoblastisches Lymphom
undiff. = undifferenziert

4. Pseudolymphome

Die fünf mit der PAP-Technik untersuchten Pseudolymphompräparate zeigten in der Mehrzahl (4/5) polyklonale Plasmazellen, die vorwiegend im Randbereich der Infiltrate und in kollagenen Faserbündeln lagen. Sie enthielten zumeist IgG und IgA vom kappa oder lambda Typ, selten IgM. Dabei lag der Anteil Ig-bildender Zellen am Gesamtinfiltrat stets unter 3 % (Tab. 10).
Lysozym bzw. Alpha$_1$-Antichymotrypsin positive Zellen konnten nur gelegentlich nachgewiesen werden.
In Fällen in denen die Herkunft intrazytoplasmatischen Immunglobulins fraglich war, wurden Doppelfärbungen für kappa und lambda durchgeführt.

Tabelle 10: Immunzytochemische Charakterisierung von Infiltratzellen bei Pseudolymphomen +)

Nr.	Infiltratmenge 1+ bis 4+	Intrazell. Darstellung von kappa	lambda	IgG	IgA	IgM	Ly	Ac	Verteilungsmuster von CIg
1	++	2	1	1	1	1	0	0	DI
2	++	1	1	1	1	0	-	0	DI/R
3	+	0	0	0	0	0	0	0	-
4	+++	1	1	1	1	1	-	2	DI
5	+++	1	2	1	1	1	-	0	DI

Ly = Lysozym
Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin
CIg = intrazelluläres Immunglobulin
DI = Diffus intrazytoplasmatisch
R = Ringförmig
+) = alle Zahlenangaben in %

5. Tumoren der histiozytären Reihe

In der Gruppe der histiozytären Neoplasien gelangten elf Patienten zur Untersuchung (Tab. 12). Dabei lag das Hauptgewicht auf dem Nachweis von intrazytoplasmatischen Lysozym und Alpha$_1$-Antichymotrypsin, deren spezifische Bedeutung für den histiozytischen Zellcharakter von Papadimitriou et al. (54) dargestellt wurde.

In sieben Präparaten waren 30 - 80 % der Zellen für Lysozym und Alpha$_1$-Antichymotrypsin positiv; in zwei Fällen waren kaum (1 - 2 %), in zwei weiteren keine histiozytischen Marker nachweisbar. Die histiozytoiden Zellen lagen disseminiert über das gesamte Tumorareal, ohne Bevorzugung bestimmter Orte. Fast immer waren Lysozym positiven Granulozyten vorhanden; in einem Präparat (Nr. 11) fielen sie als intra- und perivasale Zellaggregationen auf.

Ig-bildende Plasmazellen waren in nennenswerter Anzahl nur bei drei von elf Fällen zu finden. Die Mehrzahl (7/11) enthielt keine oder nur sehr wenige Ig-bildende Zellen. Es handelte sich um polyklonale Zellen, die vorwiegend IgG vom kappa- oder lambda-Typ produzierten, daneben auch IgA und IgM. Sie lagen in kleinen Gruppen hauptsächlich im Randgebiet der histiozytischen Tumoren, perivasal oder an bindegewebigen Septen.
Bemerkenswert ist, daß die Gesamtzahl der Ig-bildenden Zellen (d.h. die Summe der kappa und der lambda positiven Zellen) nie die Summe der Lysozym und Alpha$_1$-Antichmotrypsin positiven Zellen übersteigt (Tab. 11).

Tabelle 11: Quantitativer Vergleich zwischen Ig-bildenden und histiozytären Zellen bei Neoplasien der histiozytären Reihe

Ly u. Ac positive Zellen	50	83	2	1	40	40	30	30	55	%
kappa u. lambda positive Zellen	35	10	2	0	0	0	10	1	1	%

Ly = Lysozym positive Zellen
Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin positive Zellen
% = prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl

6. Entzündliche Infiltrate

Den größten Anteil an der Untersuchung hatten epitheliale Tumoren, vier Basaliome und ein spinozelluläres Karzinom. Daneben wurden zwei Präparate unspezifischer Hautreaktionen bei NHL, ein peritumorales Infiltrat bei malignem Melanom sowie ein perizystisches Infiltrat immunmorphologisch beurteilt (Tab. 13).
Im peritumoralen Infiltrat aller Basaliome fanden sich zwischen 1 und 15 % Plasmazellen, die in Nestern dem Tumorrand anlagen und verschiedene Immunglobuline produzierten. Überwiegend handelte es sich bei den Immunglobulinen um IgG und IgA vom kappa- oder lambda-Typ; IgM kam nur in Spuren zweimal vor.

Tabelle 12: Immunzytochemische Charakterisierung von Neoplasien aus der histiozytären Reihe

Nr	Infiltrat-menge 1+ bis 4+	Intrazellulare Darstellung von kappa	lambda	IgG	IgA	IgM	Ly	Ac	Diagnose:
1	++++	15	20	20	15	15	50	0	Sinushistiozytose
2	++	0	0	-	-	-	0	0	atypische Histiozytose
3	+	8	2	5	3	0	3	80	Elastogranulom
4	+++	1	1	1	1	-	2	0	Histiozytom
5	++	0	0	-	-	-	0	0	Histiozytom
6	+++	0	0	-	-	-	1	0	Histiozytom
7	++++	0	0	0	-	-	10	30	histiozytisches Lymphom
8	++++	0	0	0	0	0	40	40	echtes histiozytisches "Lymphom"
9	+++	5	5	-	-	-	5	25	Histiozytom
10	+++	1	1	1	1	0	10	20	benigne Histiozytose
11	+++	1	1	-	-	-	15	40	maligne Histiozytose

Alle Zahlenangaben in %

Ly = Lysozym

Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin

Das peritumorale Infiltrat in dem Präparat von spinozellulärem Karzinom enthielt in hohem Maß (50 %) Ig-bildende Plasmazellen in gleicher Lokalisation wie bei den Basaliomen. Vorherrschend war IgG vor IgA (9 : 1), wobei kappa und lambda in gleicher Menge gefunden wurden. IgM war nicht nachzuweisen (Abb. 9).
In allen beschriebenen epithelialen Tumoren waren einige histiozytäre Zellen disseminiert im Infiltrat darstellbar.
Im peritumoralen Infiltrat des malignen Melanoms fanden sich ähnliche Verhältnisse wie beim spinozellulären Karzinom, lediglich der Anteil Ig produzierender Zellen am Gesamtinfiltrat war mit 5 % deutlich geringer.
In zwei Präparaten unspezifischer Hautreaktionen bei NHL kamen polyklonale Plasmazellnester mit intrazytoplasmatischem IgG bzw. IgA vom kappa- oder lambda-Typ im angrenzenden Bindegewebe zur Darstellung. Histiozytäre Zellen fehlten.
In dem einen Präparat einer mukoiden Zyste fanden sich im perizystischen Infiltrat keine Immunglobuline; im Zysteninhalt dagegen kamen zahlreiche Lysozym und Alpha$_1$-Antichymotrypsin positive Granulozyten und Makrophagen zur Darstellung.
Vier Präparate entzündlicher Hautinfiltrate waren unbekannter Genese. Der Anteil Ig-bildender Plasmazellen lag bei ihnen zwischen 20 und 100 %; sie waren vor allem im Infiltratrandbereich lokalisiert.
Bei den Immunglobulinen handelte es sich meist um IgG, weniger um IgA; nur in einem Präparat waren Spuren von IgM nachweisbar (Tab. 13); dabei betrug das Verhältnis kappa zu lambda nahezu immer 1 : 1.

Abbildung 9: Peritumorales Infiltrat bei spinozellulärem Karzinom. Darstellung kappa- und lambda-Ketten produzierender Zellen mittels Doppelfärbung. (braun: kappa-Kette; blau: lambda-Kette).

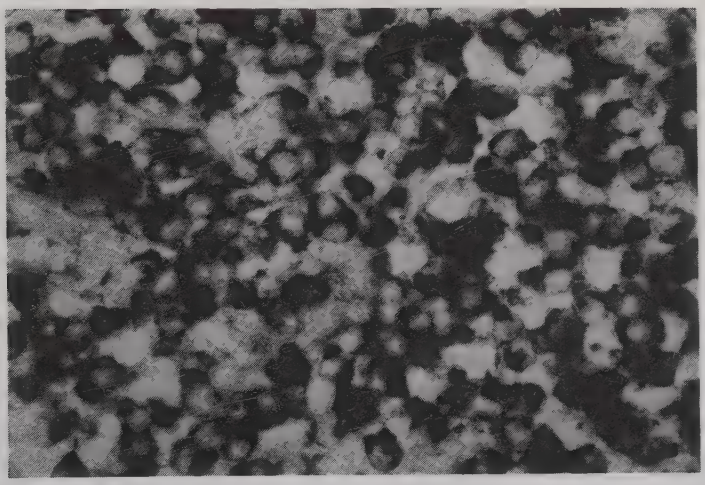


Tabelle 13: Immunzytochemische Charakterisierung entzündlicher Infiltrate

Nr.	Diagnose	Infiltratmenge 1+ bis 4+	Intrazell.Darstellung von kappa	lambda	IgG	IgA	IgM	Ly	Ac
1	Bas	++	3	1	3	1	1	-	10
2	Bas	+	1	1	1	1	0	-	10
3	Bas	++	10	5	10	5	0	1	1
4	Bas*	+	2	1	1	1	1	5	20
5	NHL	+	15	15	25	5	0	0	0
6	NHL	+	2	2	1	3	0	0	0
7	SpC*	++	25	25	45	5	0	-	5
8	MM	+	2	3	5	1	0	-	5
9	pcI	+++	0	0	-	-	-	70	70
10	ubG	++	10	10	13	6	1	10	0
11	ubG	++	30	30	55	5	0	0	0
12	ubG*	++	60	40	100	0	0	-	-
13	ubG	++	20	20	38	2	0	20	20

Ly = Lysozym
Ac = $Alpha_1$-Antichymotrypsin
Bas = Basaliom
SpC = Spinozelluläres Karzinom
* = Doppelfärbung für kappa- und lambda-Ketten
MM = malignes Melanom
pcI = perizystisches Infiltrat
ubG = unbekannte Genese

7. Infiltrate bei verschiedenen Dermatosen

In dieser neun Präparate umfassenden Gruppe wurden Infiltrate einiger Dermatosen immunmorphologisch untersucht (Tab. 14).

In Präparaten von Rosazea, Lichen ruber und eines myeloischen Prozesses fehlten Ig-bildende Zellen völlig.

Bei Pemphigus und Lupus erythematodes dagegen waren intrazytoplasmatische Ig nachweisbar, in der Hauptsache IgG vom kappa- und lambda-Typ.

In einem Fall von Nekrobiosis lipoidica waren gleich große Mengen von IgG und IgA bildenden Zellen zu finden.

Präparate von Lues II und Balanitis plasmazellularis wiesen IgG, IgA und IgM (kappa und lambda) produzierende Zellen auf, wobei IgG an erster Stelle stand. Alle polyklonalen Zellen lagen überwiegend nestförmig gruppiert in den Infiltraten vor.

Bis auf die Fälle von Lues II und Nekrobiosis lipoidica zeigten alle Präparate eine Beteiligung von Alpha$_1$-Antichymotrypsin positiven histiozytären Zellen, die um die Infiltrate gelegen waren.

Tabelle 14: Immunzytochemische Charakterisierung von Infiltraten bei verschiedenen Dermatosen

Diagnose	Infiltratmenge	Intrazelluläre Darstellung von:						
	1+ bis 4+	kappa	lambda	IgG	IgA	IgM	Ly	Ac
Rosazea	++	0	0	0	0	0	-	5
Pemphigus	++	25	5	30	0	0	-	5
Lupus eryth.	++	1	1	2	0	1	-	5
Lichen ruber	++	0	0	0	0	0	-	8
Nekrobi.lip.*	+	3	2	2	3	0	-	0
Chron.Myelose	+++	0	0	0	0	0	30	5
Lues II	++	10	5	15	2	3	-	0
Balan.pl.**	++	30	20	30	20	1	5	2

Ly = Lysozym
Ac = Alpha$_1$-Antichymotrypsin
* = Nekrobiosis lipoidica
** = Balanitis plasmazellularis

Alle Zahlenangaben in %

IV. DISKUSSION

1. Die einfache Immunperoxidase-Methode

1.1. Vorteile der PAP-Technik

Grundlage der modifizierten Versuchsausarbeitung waren die methodischen Anleitungen von Metz/Leder (50) und Radaszkiewicz (56), auf deren Versuchsanordnungen aufgebaut wurde.

Die PAP-Technik ist eine sehr sensitive und gut reproduzierbare Methode zur Darstellung intrazellulärer Immunglobuline und Enzyme. Ihr großer Vorteil ist die Herstellung dauerhafter Präparate von - im Vergleich zu Kryostatschnitten - hoher morphologischer Qualität.

Gegenüber der ursprünglichen "Vier-Schritt-Technik" von Sternberger (64), die noch mit Zugabe freier Peroxidase arbeitet, brachte die Weiterentwicklung zur PAP-Methode einige Vorteile: Grundlage für die histochemische Bedeutung des PAP-Komplexes ist seine im Vergleich zu anderen löslichen Antigen-Antikörper Komplexen hohe Stabilität mit einer Assoziationskonstanten von 10^8 (63). Dies führt zu einer Verringerung falsch negativer Reaktionen, da ein Ablösen des Enzyms vom Antikörper bei Waschvorgängen erschwert wird. Die im Vergleich zur Immunfluoreszenz 100 - 1000fach höhere Sensitivität der PAP-Methode (Taylor,69) wird von anderen Autoren (45) bestritten. Sie sehen die Ursache für die Überlegenheit der Immunperoxidase vor allem in der mangelnden Reinheit der konjugierten Antikörper, die bei der Immunfluoreszenz verwendet werden.

Der Versuch, den PAP-Komplex durch ein Antiperoxidase-Enzym Konjugat zu ersetzen, schlug fehl (66).
Die guten Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit der PAP-Technik erzielt wurden, werden von zahlreichen Autoren bestätigt (3,26,31,56,68). Die hohe Sensitivität bringt allerdings einige Probleme mit sich.

1.2. Hintergrundfärbung und Möglichkeiten zu ihrer Verringerung

Teilweise erschwert eine unterschiedlich ausgeprägte Mitanfärbung von Interzellularräumen und bindegewebigen Faseranteilen die Abgrenzung positiver Zellen bei der Ig Darstellung. Zwei Hauptursachen sind dafür verantwortlich (68):
- Zum einen die unspezifische Hintergrundfärbung auf Grund nicht immunologischer Bindung von Antikörpern der PAP-Sequenz an das Gewebe. Diese unspezifischen Bindung betrifft vor allem den Primärantikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Hintergrundfärbung durch eine Vorinkubation mit Schweinenormalserum zu verringern.
- Zum anderen eine spezifische Hintergrundfärbung durch die Darstellung freier, interzellulärer Immunglobuline, die zusammen mit anderen Serumeiweißen wie Albumin im Gewebe vorhanden sein können.
Auffällig ist, daß positive Hintergrundfärbung für die beiden leichten Ketten und IgG wesentlich häufiger auftritt als für IgA und gar IgM. Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache ist der unterschiedliche Anteil der Ig Klassen am Serumeiweiß (Tab. 15). Die Intensität der unspezifischen

Hintergrundfärbung ist direkt abhängig vom Anteil der betreffenden Ig-Klassen in der Extrazellulärflüssigkeit; darüber hinaus besteht eine indirekte Relation zum Molekulargewicht. So hat IgM mit dem größten Molekulargewicht und dem niedrigsten Serumgehalt den geringsten Anteil an der unspezifischen Hintergrundfärbung. Diese Erklärung wird auch von Mason (45) für die unterschiedliche Eiweißaufnahme in die Zelle angeführt.

Tabelle 15: Molekulargewicht verschiedener Ig-Klassen und ihr Serumanteil

Typ	IgG	IgA	IgM
Molekulargewicht	150000	160000	900000
Gehalt im Serum (g %)	0,9-1,5	0,14-0,26	0,07-0,18

Ein Versuch, diese unspezifische Hintergrundfärbung zu mindern, und eventuell die spezifische Färbung zu verstärken, ist die proteolytische Andauung der Gewebeschnitte vor der Inkubation mit den Antikörpern der PAP-Sequenz. Dieses Verfahren, das von mehreren Autoren beschrieben wird (25, 30), beinhaltet einige technische Schwierigkeiten, die seine Anwendungsmöglichkeiten einschränken: Einmal ist es für Routine - und Serienuntersuchungen schlecht geeignet, da die Antikörperverdünnungsstufen für proteolytisch vorbehandelte Präparate neu festgelegt werden müssen, um eine starke Überfärbung zu verhindern (45).

Zum zweiten ist die optimale Proleolysezeit von Fall zu Fall sehr unterschiedlich und muß erst durch Vorversuche ermittelt werden. Der Wirkungsmechanismus der proteolytischen Andauung ist ungeklärt; Hautzer (30) nimmt eine Demaskierung zellulärer Antigene an.
Bei Immunglobulindarstellungen wirft die proteolytische Vorbehandlung neue Probleme auf: Sie führt nicht nur zu einer verstärkten Anfärbung zellulärer Immunglobuline, sondern kann auch durch die Fixierung maskiertes Ig erstmals sichtbar machen. Folge ist oft das Gegenteil des erwünschten Effektes, nämlich die Überfärbung interzellulärer Substanzen und des angrenzenden Bindegewebes. Daneben ist die Zusammensetzung aus zellulären und Faserbestandteilen in jedem Präparat anders und damit auch die Haftung des Gewebeschnittes auf dem Objektträger. Diese Tatsache führt oftmals schon nach kurzen Proteolysezeiten zur Loslösung und Zerstörung der Schnitte. Unter Berücksichtigung der vorgenannten Probleme ist eine Verringerung der Hintergrundfärbung durch proteolytische Andauung erzielbar; eine routinemäßige Anwendung scheint jedoch nicht zweckmäßig.
In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verringerung der Hintergrundfärbung durch folgende zwei Schritte erzielt:

- Durch Blockierung der endogenen Peroxidase mittels 20 minütiger Inkubation in 0,3 % H_2O_2 in absolutem Methanol Stärkere Konzentrationen, wie von Banks (2) empfohlen, sind nicht sinnvoll, da die Schnitte zu sehr angegriffen werden. Auch eine 24stündige Inkubation in absolutem Methanol brachte keine Verbesserung, sondern verschlechterte eher die morphologische Qualität.

- Durch eine Vorinkubation mit Normalserum, um eine unspezifische Anlagerung des intermediären Antikörpers zu verhindern. Dabei erwies sich eine 10minütige Inkubation mit unverdünntem Schweinenormalserum bei Zimmertemperatur als vorteilhaft. Wichtig ist, daß sich daran kein Waschvorgang mit Pufferlösung anschließt, um die schwachen Bindungen zwischen Serumglobulinen und Gewebsantigenen nicht zu zerstören.
  Eine Erwärmung des Normalserums oder eine Inkubation der Präparate mit einer 1 %igen wäßrigen Eialbuminlösung wie vorgeschlagen (2) brachten keine besseren Ergebnisse.

Entscheidend war weiterhin die hohe Verdünnung der verwendeten Antikörper sowie die mikroskopische Kontrolle der Enzym-Substrat-Reaktion:
Die Reaktion wurde gestoppt, wenn nach Darstellung zellulärer Antigene die Anfärbung bindegewebierg Strukturen deutlich wurde. Damit gelang es meistens, die Hintergrundfärbung so weit zu reduzieren, daß klare Beurteilungen möglich waren.

1.3. Fixierung und Spezifität

Die Spezifität der PAP-Methode ist nach Ergebnissen von Bergroth et al. (6) auch von der Art der Materialfixierung abhängig:
Falsch positive Zellen waren nach Fixierung mit Azeton oder Alkohol deutlich häufiger als nach Formolfixierung, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Bersonders häufig färbten sich polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen

falsch positiv an. Die relativ schwache Hintergrundfärbung erhöhte die Gefahr einer Fehlinterpretation als "spezifische Färbung" noch weiter.
Ursache dieser falsch positiven intrazytoplasmatischen Anfärbung ist wahrscheinlich eine unspezifische Anlagerung des Sekundärantikörpers an Gewebsproteine als Folge der Alkohol - bzw. Azetonfixierung.

1.4. Austitrierung der Antikörper

Die optimale Konzentration der einzelnen Antikörper wurde in mehreren Verdünnungsreihen in Größenordnungen von 1/50 bis 1/1200 ermittelt. Sie stellt einen Kompromiß zwischen unspezifischer und spezifischer Färbung dar: Ist der Antikörper zu stark konzentriert, so wird die Hintergrundfärbung derart verstärkt, daß positive Zellen von ihrer Umgebung nicht mehr abzugrenzen sind. Zellmorphologie sowie Lokalisation des Antigens in der Zelle sind dann nicht mehr beurteilbar. Ist die Antikörperverdünnung dagegen zu hoch, wird zum einen die Entwicklungsreaktion extrem verlängert, was zu Gewebsschäden führt, zum anderen ist die Erkennung positiver Zellen wesentlich erschwert.

1.5. Unspezifische Serumabsorption

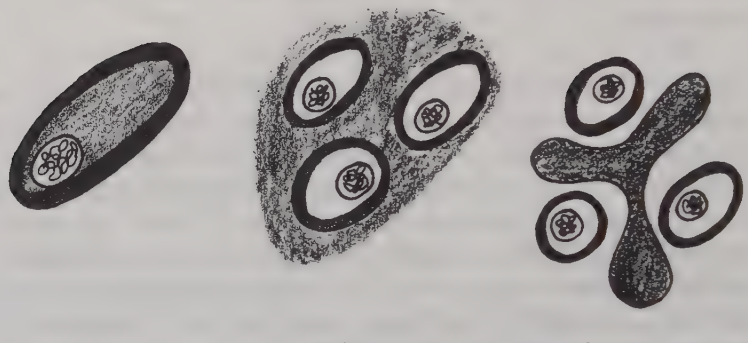
Ein weiteres Problem bei der Differentialdiagnostik von mono- und polyklonalen Zellen ist die unspezifische Serumaufnahme. Zellen, die derartige "exogene" Immunglobuline enthalten, sind oft schwierig zu erkennen, da eine verdächtige Hinter-

grundfärbung, die auf extrazelluläre Immunglobuline hinweist, fehlen kann - wie es in einigen untersuchten Präparaten der Fall war. Morphologisch sind diese Zellen praktisch nicht von anderen mit "endogenem" Immunglobulin abgrenzbar.

Die Ursache der unspezifischen Serumaufnahme wird von mehreren Autoren (31,45) in einer passiven Absorption gesehen: Extrazelluläres Protein permeiert undichte Zellmembranen ("leaky cells") und dringt in die Zellen ein; in der Folge kann restliches, extrazelluläres Protein durch verschiedene Behandlungsschritte zerstört werden - nur intrazelluläre Serumproteine bleiben übrig. Der Grund für das Eindringen von Serumeiweißen in die Zelle wird zum Teil in einer mangelnden Fixation vermutet (44).

Man kann jedoch einige morphologische Kriterien zusammenstellen, die auf unspezifische Serumabsorption hinweisen:
- Die Zelle ist diffus gefärbt, mit zum Randbereich zunehmender Intensität (Abb. 10 a)
- Die randbetonte Färbung mehrerer benachbarter Zellen geht ineinander über (Abb. 10 b)
- Zwischen den Zellen und im Bindegewebe liegen stark gefärbte Substanzen (Abb. 10 c)
- Die gefärbten Zellen sehen unscharf begrenzt und verquollen aus (degenerative Veränderungen)
- Die positiven Zellen liegen oft um Gefäße, die ebenfalls gefärbtes Serum enthalten.

Abbildung 10: Typische Zeichen unspezifischer Serumabsorption



a) b) c)

1.6. Spezifische Marker zum Nachweis exogenen Proteins

Eine Möglichkeit Zellen mit "exogenem" von Zellen mit "endogenem" Immunglobulin abzugrenzen, ist die Immunperoxidasefärbung mit Anti-Humanalbumin. Ein intrazellulärer Albuminnachweis ist wegen des hohen Albumingehaltes im Serum gleichbedeutend mit unspezifischer Serumabsorption (24).

Eine andere Möglichkeit ist die Darstellung der J-Kette, einer Polypeptidkette von niedrigem Molekulargewicht (15000), die zum ersten Mal 1970 von Halpern und Koshland (29) aus polymeren IgA und IgM isoliert wurde. Die Aufgabe der J-Kette, die anfangs nur in der Mithilfe bei der Ig Polymeri-

sation gesehen wurde, ist bis heute unklar. Die Tatsache, daß sie auch in Zellen vorkommt, die nur monomeres Ig produzieren (9), läßt vermuten, daß sie mehr als eine biologische Rolle spielt. Diskutiert wird u.a. eine Beteiligung am transepithelialen Transport von sekretorischem Ig (27).

Nach neueren Erkenntnissen (47) ist die J-Kette nicht nur in polymeren IgA und IgM enthalten, sie ist auch im Zytoplasma Ig-bildender Zellen verschiedener, lymphoider Neoplasien nachweisbar.
In gesunden Zellen verliert sich die Fähigkeit zur J-Kettensynthese mit fortschreitender Ausreifung, ausgenommen in IgA und IgM bildenden Zellen. Der Nachweis von J-Ketten ist somit ein Hinweis auf Ig Synthese in einem nicht ausgereiften Zellstadium, z.B. Ig produzierende Zellen bei Immunozytomen. Dies gilt aber nicht uneinschränkt für alle NHL. Laurent (33) konnte bei den meisten immunoblastischen Lymphomen keine J-Ketten nachweisen, unabhängig davon welche Ig-Klasse sie produzierten.

Ein weiteres Verfahren zur Abgrenzung exogener Immunglobuline ist die Doppelfärbung für kappa und lambda: Eine normale, Ig produzierend Zelle stellt nur eine Antikörperklasse her, entweder vom kappa- oder lambda-Typ; sie färbt sich demnach braun oder blau. In Zellen, die unspezifisch Ig aufgenommen haben, lassen sich beide leichten Ketten nachweisen: Sie zeigen eine grau-braune Mischfarbe.

2. Indirekte Doppelfärbung von kappa und lambda

2.1 Technik

Die Doppelfärbung lieferte ein farblich gut kontrastierende Markierung von kappa (rotbraun) und lambda (blau) positiven Zellen. Die Anzahl der kappa und lambda enthaltenden Zellen stimmten mit der aus Einfachfärbungen erhaltenen gut überein, ein Zeichen, daß in der Doppelfärbung keine Kreuzreaktionen zwischen den beiden Primärantikörpern stattfanden.

Eine unabdingbare Voraussetzung für das Gelingen der Doppelfärbung ist ein getrenntes Funktionieren der beiden Einzelschritte. Fehler und Mängel, wie zu starke Hintergrundfärbung, die bereits bei der Einzelfärbung auftreten, summieren sich bei der Kombination der beiden Schritte. Um gleich starke Färbungen mit den Peroxidase und alkalische Phosphatase - markierten Antikörpern zu erhalten, sind getrennte Verdünnungsreihen auszutesten; nach den vorliegenden Erfahrungen sind die Antikörpertiter der, aus verschiedenen Spezies gewonnenen Seren, keineswegs gleich hoch. So wird z.B. in der verwendeten, indirekten Doppelfärbung das Maus anti-lambda-Serum in zehnfach höherer Konzentration aufgetragen als das anti-kappa-Serum vom Kaninchen. Darüber hinaus wurde die Entwicklung beider Enzymreaktionen einzeln mikroskopisch kontrolliert, um die Interpretation nicht durch zu große, farbige Substratmengen zu erschweren.
Die einzelnen Waschvorgänge zwischen den Inkubationen sind hier von besonderer Bedeutung, da ungenügende Entfernung überschüssiger Antikörper zu immenser Verstärkung der Hintergrundfärbung führt.

2.2. Vorteile der Doppelfärbung

In der Vergangenheit sind bereits einige Versuche unternommen worden, zwei Antigene in einem Präparat darzustellen. Der entscheidende Vorteil der verwendeten Methode ist die dauerhafte, gleichzeitige Anfärbung zweier verschiedener Antigene. Bei der Immunfluoreszensdoppelfärbung dagegen werden die beiden Marker nacheinander mit unterschiedlichen Filtersystemen untersucht.
Die gleichzeitige Darstellung hat praktische Konsequenzen: So kann die zahlenmäßige Verteilung verschiedener Antigene innerhalb eines Präparates leichter beurteilt werden. Die Lokalisation und das Verhältnis von kappa zu lambda positiven Zellen zeigt sich wesentlich deutlicher.
Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, verschiedene Ig innerhalb derselben Zelle nachzuweisen, was bei homogener Verteilung zu einer grau-braunen Mischfarbe führt.
Schließlich wird mit der beschriebenen, indirekten Technik der zeitliche Aufwand und die Komplexität soweit gesenkt, daß diese sensitive immunenzymatische Methode eine echte Alternative zur relativ schneller durchführbaren Doppelimmunfloureszenz darstellt.

2.3. Vergleich der verwendeten indirekten Doppelfärbung mit der "unlabeled antibody enzyme"-Technik nach Mason

Ein Problem der Methode nach Mason (43,46), die auf der Vier-Schritt-Technik von Sternberger basiert (siehe Kapitel I. 2.3.) sind falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen auf verschiedenen Stufen des Reaktionsablaufs (48):

Zum einen sind dies Kreuzreaktionen zwischen Immunglobulinen verschiedener Spezies, zum andern zwischen Sekundärantikörpern und Gewebsimmunglobulinen.
Weiterhin ist eine diffuse, unspezifische Färbung auf Grund einer Kreuzreaktion zwischen dem Normalserum der Vorinkubation und den Sekundärantikörpern einer der beiden Spezies problematisch.

Die hier verwendete Technik ist mit zwei Inkubationsschritten zeitlich wesentlich kürzer als die Methode nach Mason (vier Schritte). Darüber hinaus ist die Zahl der verschiedenen Antikörper von sechs auf vier, die Zahl verschiedener Spezies von vier auf drei gesenkt. Dies ist wahrscheinlich, in Verbindung mit gründlichen Waschvorgängen, der Hauptgrund für die Verringerung der Kreuzreaktionen; falsch positive Ergebnisse wurden nicht beobachtet.

Ein weiterer Vorteil der indirekten Technik ist die gering ausgeprägte, diffuse unspezifische Färbung: Bei der "unlabeled antibody" Methode stammen die sekundären, "middle bridging" Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies; nur eine von ihnen liefert das Normalserum zur Vorinkubation der Schnitte. Damit besteht immer die Gefahr von Kreuzreaktionen zwischen den beiden Spezies. In der verwendeten Technik stammen beide sekundären Antikörper und das Normalserum aus einer einzigen Spezies (Ziege); dadurch wird dieses Risiko vermindert.

3. Proliferative und entzündliche Infiltrate

3.1. Maligne Non-Hodgkin Lymphome

Der Nachweis von Ig Bildung in einer Zelle gilt als Kriterium für den B-Zellcharakter. Dabei ist die Tatsache, daß in einer Zellpopulation nur eine einzige, monoklonale Ig Klasse darstellbar ist, ein Zeichen neoplastischen Ursprungs (26,31,56,69).

Die PAP-Methode ist eine der wenigen histochemischen Techniken (70), die es erlauben, eine monoklonale Proliferation im histologischen Schnitt zu identifizieren; dabei kann die Ig Produktion so gering sein, daß im Serum keine Gammopathie nachweisbar ist.

Der überwiegende Teil der NHL sind Tumoren der B-Zellreihe. Manche Tumorzellen sind soweit differenziert, daß sie Ig bilden, welches dann immunmorphologisch darstellbar ist. Nicht immer ist aber der monoklonale Charakter auf Anhieb erkennbar: Der Anteil Ig-bildender Tumorzellen an der Gesamtzellzahl ist oft gering; dazu kommt, daß nahezu bei allen NHL in unterschiedlichem Maß reaktive Plasmazellen zu finden sich - unabhängig von einer Ig Produktion der Tumorzellen. Diese polyklonalen Zellen, die morphologisch oft kaum von neoplastischen, lymphoiden Zellen zu unterscheiden sind, gilt es abzugrenzen. Nach den vorliegenden Ergebnissen enthalten reaktive Plasmazellen vorwiegend IgG, weniger IgA und selten IgM; dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein (56,69).

Die untersuchten Fälle von Mykosis fungoides bilden keine intrazytoplasmatischen Immunglobuline, was definitionsgemäß dem T-Zellcharakter entspricht.
In den Präparaten von chronisch lymphatischer Leukämie finden sich ebenfalls keine Ig; nach Seligmann (60) haben diese Zellen einen Block in der Ausreifung zu Ig sezernierenden Zellen und sind deshalb immunmorphologisch negativ. Übereinstimmende Ergebnisse finden sich bei Isaacson (31), Radaszkiewicz (56) und Taylor (69). Geringe Populationen polyklonaler Begleitinfiltrate sind sowohl bei der Mykosis fungoides als auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie nachweisbar.
Bei der immunmorphologischen Untersuchung von zentroblastischen - zentrozytischen Lymphomen fand Radaszkiewicz (56) in etwa 1/4 der Fälle Ig in einem "honigwabenartigen" Muster (vorwiegend IgG), deren intra- und extrazelluläre Lage er nicht erkennen konnte. Ein in dieser Arbeit untersuchtes Präparat von zentroblastisch - zentrozytischem Lymphom zeigt dagegen in 50 % IgG/kappa bildende Tumorzellen, deren Ig deutlich als paranukleäre Einschlußkörperchen vorliegen.

Die Immunozytome sind durch ein Zellbild charakterisiert, das vorwiegend aus plasmozytoiden Zellen und ihren Vorläufern besteht (10,39). Alle untersuchten Immunozytome zeigen eine monoklonale Ig Produktion, wobei Immunozytome vom Typ IgM/kappa am häufigsten waren. Die Differentialdiagnose zwischen chronisch lymphatischer Leukämie und Immunozytom auf rein morphologischer Ebene ist nicht scharf. Deshalb sehen Lennert (39) und Radaszkiewicz (56) im immunmorphologischen Nachweis von monoklonalen Ig allein das entscheidende Kriterium für die Diagnose Immunozytom.

Eine Schwierigkeit dabei ist, daß die neoplastischen Zellen in unterschiedlichem Maß Ig bilden: Bei den untersuchten Fällen lag die Zahl der Ig positiven Zellen zwischen 10 und 80 %. Zum andern ist es oft problematisch, hinter einem reaktiven, polyklonalen Infiltrat eine monoklonale Zellproliferation zu erkennen, da sich neoplastische Plasmazellen rein morphologisch von reaktiven nicht unterscheiden. Entscheidend war deshalb bei allen Immunozytomen das Verhältnis von mono- zu polyklonalen Zellen, das mindestens um den Faktor 10 zugunsten der monoklonalen höher lag. Auch die Anordnung Ig positiver Zellen ist eine diagnostische Hilfe: Monoklonale Zellen liegen in Gruppen, während reaktive Plasmazellen locker verstreut, besonders im Tumorgrenzgebiet, an Septen und neben Gefäßen vorkommen.

Von den untersuchten Lymphomen hohen Malignitätsgrades zeigten weder die zentroblastischen noch die lymphoblastischen eine deutliche Ig Bildung. Lediglich geringe Mengen an polyklonalem Begleitinfiltrat im Randbereich - vorwiegend IgG - waren darstellbar. Zu ähnlichen Befunden kamen auch Isaacson (31) und Radaszkiewicz (55).

Die untersuchten immunoblastischen Lymphome bilden, wie in der Literatur bestätigt (56), eine sehr heterogene Gruppe: In einem Fall war keinerlei monoklonale Ig Bildung zu finden, lediglich einige reaktive Zellen lagen im Randbereich und an bindegewebigen Septen. In einem weiteren Präparat führte die monoklonale Produktion von kappa-Ketten zu einer Membrankonturierung nahezu aller Tumorzellen.

Auch die Abgrenzung zur morphologisch ähnlichen Gruppe der Pseudolymphome wird durch den intrazellulären Ig Nachweis erleichtert. Pseudolymphome zeigten eine geringe Zahl diffus verstreuter polyklonaler Infiltratzellen, vorherschend IgG und IgA. Damit unterscheiden sie sich deutlich von malignen, Ig-bildenden Lymphomen, die ein monoklonales Bild aufweisen (Braun-Falco et al., 11, Burg et al., 15).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die PAP-Technik, ergänzt durch die Doppelfärbung, eine wertvolle Hilfe in der Differentialdiagnose lymphoider Tumoren ist. Sie erlaubt, eine monoklonale Proliferation zu erkennen und von einem gleichzeitig vorhandenem Begleitinfiltrat abzugrenzen. Zusammen mit der Darstellung histiozytischer Markerenzyme ermöglicht sie eine weitergehende Differenzierung von mononukleären Infiltraten (16,17,18,28).

3.2. Tumoren der histiozytären Reihe

Zur Identifizierung von Zellen aus der mono- histiozytären Reihe wurden routinemäßig die Enzyme Lysozym und $Alpha_1$-Antichymotrypsin nachgewiesen, auf deren diagnostische Bedeutung in Arbeiten von Mason und Taylor (42) und Papadimitriou (54) hingewiesen wurde.
Nach Papadimitriou ist die Darstellung des Proteaseinhibitors $Alpha_1$-Antichymotrypsin am Paraffinschnitt ein gewichtiger Hinweis auf den histiozytischen Charakter einer Zelle (Tab. 16).
Die untersuchten Tumoren der histiozytären Reihe sind zum größten Teil für eines oder beide Markerenzyme positiv;

sie liegen als diffus im Zytoplasma verteilte Granula vor. Zu ähnlichen Befunden kommen auch Meister und Nathrath (49). Dabei ist die Zahl der Lysozym und/oder $Alpha_1$-Antichymotrypsin positiven Zellen großen Schwankungen unterworfen.

Eine Erklärung dafür ist evtl. in einem unterschiedlichen Funktionszustand der Zellen zu suchen. Nach Papadimitriou (54) scheint bei Leukozyten und Makrophagen eine Abhängigkeit zwischen der Intensität der Färbung und dem Funktionszustand zu bestehen: So waren in einem Blutausstrich im Vergleich zu einer unspezifischen Esterasefärbung nur etwa 10 % der Markophagen positiv für $Alpha_1$-Antichymotrypsin. Die Ursache des unterschiedlichen Enzymgehaltes könnte auf einer wechselnden Phagozytoseaktivität beruhen. Auch Mason und Taylor (42) konnten nicht in allen, sondern vorwiegend in aktivierten, reaktiven Makrophagen Lysozym nachweisen. Damit ist auch die Tatsache, daß bei Sarkoidose und Tuberkulose erhöhte Serumlysozymwerte gefunden werden (52), gut vereinbar.

Für negative Reaktionen histiozytischer Tumorzellen gibt es wahrscheinlich mehrere Erklärungen (49):

- Die Zellen sind unreif; histiozytische Merkmale sind noch nicht entwickelt.
- Die histiozytischen Qualitäten sind durch die neoplastische Veränderungen verloren gegangen.
- Die Zellen zeigen einen vorübergehenden Verlust der Enzymaktivität nach Phagozytose.

Alpha$_1$-Antichymotrypsin ist ein sehr charakteristischer, aber kein absolut spezifischer Marker für Histiozyten und Monozyten; auch Epithelzellen von Kapillaren und kleinen Gefäßen reagieren positiv. Dies schränkt seine diagnostische Bedeutung keineswegs ein, wenn morphologische Gesichtspunkte mitberücksichtigt werden. Beide Enzyme sind nach den vorliegenden Ergebnissen wertvolle Hilfen in der Diagnostik histiozytärer Infiltrate. Immunglobulin bildende Zellen in den histiozytären Tumoren sind an Hand ihrer Lokalisation und ihres polyklonalen Charakters eindeutig als reaktive Begleitinfiltrate zu identifizieren.

Tabelle 16: Intrazellulärer Alpha$_1$-Antichymotrypsinnachweis am Paraffinschnitt (modifziert nach Papadimitriou)

Zelltyp	Alpha$_1$-Antichymotrypsin (- bis 4+)
Lymphoide Zellen	-
Segmentkernige Leukozyten	- bis +
Mastzellen	++++
Makrophagen	++ bis ++++
Dendritische Retikulumzellen	-
Endothelzellen	+++
Sinushistiozyten	++++
Myelozyten	- bis +
Erythroblasten	-
Megakariozyten	-

3.3. Entzündliche Infiltrate

Neben NHL und histiozytären Tumoren waren entzündliche Infiltrate bei bestehenden Dermatosen Teil der Untersuchung. Die immunmorphologischen Befunde bei kutanen Karzinomen - Basaliom, spinozelluläres Karzinom, malignes Melanom - zeigen eine nur geringe Beteiligung Ig-bildender B-Lymphozyten. Auf Grund der guten morphologischen Qualität der Paraffinschnitte war eine genaue Lokalisation der Plasmazellen im entzündlichen Infiltrat um den Tumor möglich: Sie liegen klonal gruppiert in allen Bereichen des Infiltrates, vorwiegend im Tumorrandgebiet, teilweise auch perivaskulär und sind stets von nicht Ig prodzierenden Lymphozyten umgeben. Dies und auch die Verteilung der einzelnen Ig Klassen decken sich weitgehend mit Ergebnissen aus der Literatur.
Nach den Untersuchungen von Bustamante (20) und De Panfilis (53) sind IgA und IgG produzierende Plasmazellen bei Basaliomen und spinozellulären Karzinomen allgemein vorherrschend, während IgM nur in sehr wenigen Zellen gefunden wird.
Ig-bildende Zellen sind zwar in lymphozytären Infiltraten um kutane Karzinome anwesend, damit läßt sich aber noch keine Aussage über eine spezifische Antikörperproduktion treffen. Nach heutiger Ansicht spielt die zelluläre Immunantwort eine wesentlich bedeutendere Rolle. De Panfilis (53) fand, daß T-Zellen in weit größerer Zahl vorhanden sind als Ig-produzierende Zellen. Darüber hinaus zeigten Claudy et al. (22) mittels Zellextraktion schon früher, daß mononukleäre Zellen bei Basaliomen ein Verhältnis von

T- zu B-Lymphozyten aufweisen, das dem einer Abwehrreaktion vom Spättyp ähnelt. Hierdurch wird die Annahme einer zellvermittelten Immunantwort gerechtfertigt, die als Hauptabwehrmechanismus gegen Tumorproliferation gilt (67).

Die vorliegenden Befunde bestätigen die Ergebnisse von Burg und Braun-Falco (13) und von Bustamante (20) hinsichtlich der geringen Zahl von Plasmazellen in Infiltraten um maligne Melanome. Da Ig produzierende Zellen beim spinozellulären Karzinom häufiger vorkommen als beim malignen Melanom, läßt sich eine reziproke Beziehung zwischen der Malignität des Tumors und der Anzahl der reaktiven Plasmazellen vermuten (20). Wahrscheinlich besteht die Aufgabe der B-Zellen in peritumoralen Infiltraten in einem Synergismus zwischen zellvermittelter Immunantwort und Ig Produktion gegen Tumorantigene (22,53).

Die Untersuchung von entzündlichen Infiltraten bei verschiedenen anderen Dermatosen ergab keine oder nur sehr geringe Ig Bildung bei Rosazea, Lupus erythematodes, Lichen ruber und Nekrobiosis lipoidica. Lediglich bei Pemphigus vulgaris, Lues II und Balanitis plasmazellularis war ein großer Prozentsatz Ig-bildender Zellen nachweisbar; vorwiegend handelte es sich auch hier um IgG und IgA.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den immunmorphologischen Befunden bei kutanen Karzinomen, so ist in der Mehrzahl der Fälle mit geringer oder fehlender Ig Produktion wahrscheinlich eine T-zellvermittelte Reaktion für die Immunabwehr verantwortlich. Beispielsweise fanden sich bei Lichen ruber keine Ig positiven Plasmazellen und nur vereinzelt histiozytäre Zellen im angrenzenden Bindegewebe. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Bjerke und Krogh (7), die bei in situ Untersuchungen von Lichen planus neben Makrophagen vor allem T-Lymphozyten nachweisen konnten; B-Lymphozyten wurden nur selten gefunden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Grundlage einer modifizierten Immunperoxidase (PAP) Technik und einer neu aufgebauten indirekten Doppelfärbungsmethode wurde die Beteiligung Immunglobulin bildender und histiozytärer Zellen an insgesamt 90 dermalen Infiltraten untersucht.

Die Vorteile der PAP-Technik gegenüber der Immunfluoreszenz, sowie die Problematik der Hintergrundfärbung wurden diskutiert und verschiedene Vorbehandlungen histologischen Materials, darunter die proteolytische Andauung, untersucht.

Die entwickelte indirekte Doppelfärbung ermöglichte eine simultane Darstellung verschiedener Immunglobuline in einem Präparat und erleichterte die Abgrenzung monoklonal aufgebauter Infiltrate, die nur eine Leichtkette produzierten, von polyklonalen mit zwei Leichtketten (kappa und lambda), sowie die Erkennung unspezifischer Serumabsorption.

Auf dieser methodischen Grundlage wurden entzündliche und proliferative Infiltrate genauer charakterisiert. Bei den untersuchten 25 Non-Hodgkin-Lymphomen gelang es in der Gruppe der Immunozytome trotz unterschiedlich stark ausgeprägter Immunglobulinproduktion, monoklonale Tumorzellen von reaktiven, polyklonalen Plasmazellen abzugrenzen. Als häufigstes monoklonales Immunglobulin fand sich IgM/kappa.

Daneben wurden 11 Tumoren der histiozytären Reihe, 5 Pseudolymphome und 21 entzündliche Infiltrate immunmorphologisch untersucht.

Zum Nachweis der histiozytischen Genese diente die Darstellung von Lysozym und Alpha$_1$-Antichymotrypsin. Diese war für die meisten histiozytischen Tumoren in Form intrazytoplasmatischer Granula positiv, wobei zwischen Differenzierungsgrad und Enzymgehalt ein Zusammenhang zu bestehen scheint.

In den untersuchten entzündlichen Infiltraten von kutanen Karzinomen waren nur wenig Immunglobulin bildende Zellen nachweisbar. Wahrscheinlich kommt hier der T-zellvermittelten Immunantwort die größere Bedeutung zu.

Nach den vorliegenden Erfahrungen sind die PAP-Technik und die indirekte Doppelfärbung wertvolle diagnostische Hilfen bei der Abgrenzung monoklonaler von polyklonalen Infiltraten. Neben der Immunglobulindarstellung ist der Nachweis histiozytischer Markerenzyme Grundlage für eine weitergehende Differenzierung dermaler Infiltrate.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Avrameas S. and Uriel J. (1966)
Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion.
C R Acad Sci (D) (Paris) 262:2543-2545

2. Banks P.M. (1979)
Diagnostic Applications of an Immunperoxidase Method in Hematopathology
J Histochem Cytochem 27:1192-1194

3. Barr R.J., Sun N.C.J. and King D.F. (1980)
Immunperoxidase Staining of Cytoplasmic Immonoglobulins
J Am Acad Dermatol (St.Louis) Vol. 3, 1:58-62

4. Becker H. (1978)
Maligne Non-Hodgkin-Lymphome: Pathomorphologische Grundlagen
Hautarzt, Suppl. III; 29:21-29

5. Bender B.L. and Jaffe R. (1980)
Immunglobulin Production in Lymphomatoid Granulomatosis and Relation to other "Benign" Lymphoproliferative Disorders.
Am J Clin Pathol 73:41-47

6. Bergroth V., Reitamo S., Konttinen Y.T. and Tolvanen E. (1982) Fixation-Dependent Cytoplasmic False-Positive Staining with an Immunperoxidase Method
Histochemistry 73:509-513

7. Bjerke J.R. and Krogh H.K. (1978)
Identification of mononuclear cells in situ in skin lesions of lichen planus
Br J Dermatol 98:605-610

8. Boorsma D.M., Nieboehr C. and Kalsbeek G.L. (1975)
Cutaneous Immunohistochemistry
J Cutan Pathol 2:294-301

9. Brandtzaeg P. (1974)
Presence of J chain in human immunocytes containing various immunoglobulin classes
Nature 252:418-419

10. Braun-Falco O., Guggenberger K., Burg G. und Fateh-Moghadam A. (1978)
Immonozytom unter dem Bild einer Acrodermatitis chronica atrophicans.
Hautarzt 29:644-647

11. Braun-Falco O., Burg G. and Schmoeckel Ch. (1981)
Recent advances in the understanding of cutaneous lymphoma
Clin Exp Dermatol 6:89-109

12. Burg G. (1980)
Enzymzytochemische und immunologische Methoden bei Pseudolymphomen und kutanen Lymphomen
Z Hautkr 55:1351-1366

13. Burg G. and Braun-Falco O. (1972)
The cellular stromal reaction in malignant melanoma. A cytochemical investigation.
Arch Derm Res 245:318-333

14. Burg G., Braun-Falco O. (1978)
Methoden zur Klassifiktion der Hautlymphome.
Hautarzt Suppl. III:5-13

15. Burg G., Braun-Falco O., Hoffmann-Fezer G. (1982)
Schmoeckel Ch.
Differentiation between pseudolymphomes and malignant B-cell lymphomes of the skin. In: Lymphoproliferative Diseases of the skin. M. Goos and E. Christophers (Hrsg)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1982

16. Burg G., Detmar U., Mason D.Y. (1982)
Charakterisierung der Monoklonalität lymphoplasmozytoider Hautinfiltrate mit einer neuen immunenzymatischen Doppelfärbemethode für Paraffinschnitte.
X. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Münster 19.-21.Nov.1982 Arch Dermatol Res (im Druck)

17. Burg G., Detmar U., Mason D.Y., Kaudewitz P., Kind P., Braun-Falco O. (1983)
Typing of immunoglobulin producing cutaneous B-cell Lymphomas using an immunoenzymatic double labeling technique for paraffin-sections
Kongress: The society for investigative dermatology, inc. and european society for dermatological research. Joint international meeting 27.4.-1.5.1983, Washington, D.C. J Invest Dermatol 80:302-382

18. Burg G., Kohda M., Detmar U., Mason D.Y. (1983)
Plasma cells accumulating arround epidermal neoplasias. Immunenzymatic double staining of paraffin sections. London - Vortrag 1983; Butterworth (im Druck)

19. Burgdorf W.H.C., Duray P. and Rosai J. (1981)
Immunohistochemical identification of lysozyme in cutaneous lesions of alleged histiocytic nature. Am J Clin Pathol 75:162-167

20. Bustamante R., Schmitt D., Pillet C. and Thivolet J. (1977)
Immunglobulin-producing cells in the inflammatory infiltrates of cutaneous tumors. Immunocytological identification in situ. J Invest Dermatol 68:346-349

21. Campbell G.T. and Bhatnagar A.S. (1976)
Simultaneous visualization by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods. J Histochem Cytochem 24:448-452

22. Claudy A.L., Viac J., Schmitt D., Alario A., Thivolet J., (1976)
Identification of mononuclear cells infiltrating basal cell carcinomes. Acta Derm Venereol (Stockh) 56:361-365

23. Coons A.H. and Kaplan M.H. (1950)
Localization of antigens in tissue cells:
II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 91:1-13

24. Coruh G. and Mason D.J. (1980)
Serum proteins in human squamous epithelium
Br J Dermatol 102:497-505

25. Curran R.C. and Gregory J. (1977)
The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin. Experientia 33:1400

26. Curran R.C. and Jones E.L. (1979)
Non-Hodkin's lymphomas: An immunohistochemical and hostological study.
J Pathol 129:179-190

27. Eskeland T. und Brandtzaeg P. (1974)
Does J chain mediate the combination of 19 S IgM and dimeric IgA with the secretory component rather than being necessary for their polymerisation?
Immunochemistry 11:161-163

28. Guggenberger K., Burg G., Schmoeckel Ch. and Detmar U. (1982)
Follow-ups in cutaneous immunocytomas.
In: Lymphoproliferative Diseases of the Skin
M. Goos und E. Christophers (Hrsg)
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1982

29. Halpern M.S. und Koshland M.E. (1970)
Novel subunit in secretory IgA
Nature 228:1276-1278

30. Hautzer N.W., Wittkuhn J.F. and McCaughey W.T.E. (1980)
Trypsin digestion in immunperoxidase staining.
J Histochem Cytochem 28:52-53

31. Isaacson P., Wright D.H., Judol M.A., Jones D.B. and Payne S.V. (1980)
The Nature of the immunoglobulin containing cells in malignant lymphoma.
J Histochem Cytochem 28:761-770

32. Kerl H. und Burg G. (1979)
Immunozytome und immunoblastische Lymphome der Haut
Hautarzt 30:666-672

33. Laurent G., Delsol G., Reyes F., Abbal M. und Mihaesco E. (1981)
Detection of J chain in lymphomas and related disorders
Clin Exp Immunol 44:620-628

34. Leder L.D. (1967)
Der Blutmonocyt,
Springer-Verlag, Berlin

35. Lennert K. (1975)
Blut und blutbildende Organe
In: Lehrbuch der allgem. Patho. und der path. Anatomie
Eder M. und Gedigk P. (Hrsg)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

36. Lennert K. (1978)
Immunoblasts (Basophilic stem cells)
aus: Malignant lymphomas. Other than Hodgkin's disease
S. 24-25 In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Bd. I/3B: Geschwülste.
E. Uehlinger (Hrsg)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1978

37. Lennert K. (1978)
Plasma cells
aus: Malignant lymphomas. Other than Hodgkin's disease
S. 26-33 In: Handbuch der speziellen pathologischen
Anatomie und Histologie, Bd. I/3B: Geschwülste.
E. Uehlinger (Hrsg).
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1978

38. Lennert K., Stein H., Kaiserling E. (1975)
Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata
Br J Cancer 31:(Suppl.II)29-43

39. Lennert K. and Burkert M. (1980)
Lymphoplasmacytic/lymphoplasmacytoid lymphoma
In: Malignant lymphoproliferative diseases, 245-247
J.G. van den Tweel et al., (Hrsg), Martinus Nijhoff
Publishers bv, Den Haag/Boston/London

40. Lukes R.J. (1978)
Funktional classification of malignant lymphoma of Lukes and Collins. In: Lymphoid Neoplasias, I. Recent Results in Cancer Research, 64:19-30. G.Mathé, M.Seligman, M.Tubiana (Hrsg), Springer-Verlag Berlin- Heidelberg-New York

41. Mason D.Y. (1980)
Lymphoproliferative disease and monoclonal gammopathie
In: Malignant lymphoproliferative diseases, 249-271
J.G. van den Tweel et. al., (Hrsg)
Martinus Nijhoff Publishers bv, Den Haag/Boston/London

42. Mason D.Y. and Taylor G.R. (1975)
The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues.
J Clin Pathol 28:124-132

43. Mason D.Y. and Sammons R. (1978)
Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents
J Clin Pathol 31:454-460

44. Mason D.Y., Bell J.I., Christensson B. and Biberfeld P. (1980)
An immunohistological study of human lymphoma.
Clin Exp Immunol 40:235-248

45. Mason D.Y. and Biberfeld P. (1980)
Technical aspects of lymphoma immunohistology
J Histochem Cytochem 28:731-745

46. Mason D.Y., Stein H., Naiem M., Abdulaziz Z. (1980)
Immunohistological analysis of human lymphoid tissue by double immunoenzymatic labelling.
Vortrag Kiel, 1980
SFB Hämatopathologie

47. Mason D.Y. and Stein H. (1981)
Reactive and neoplastic human lymphoid cells producing J chain in the absence of immunoglobulin: Evidence for the existence of J chain disease ?
Clin Exp Immunol 46:305-312

48. Mason, D.Y. and Woolston R.E. (1981)
Double immunoenzymatic labelling
Vortrag Oxford 16.-17. Juli 1981

49. Meister P. and Nathrath W. (1981)
Immunohistochemical characterization of histiozytic tumors
Diagnostic Histopathology, 4:79-87

50. Metz K. and Zeder L.-D. (1980)
Myeloma with immunohistochemically different cell populations: Implication for the validity of immunohistochemical assessment of lymphoma cell monoclonality
Klin Wochenschr 58:409-414

51. Nakane P.K, (1968)
Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat.
J Histochem Cytochem 16:557-560

52. Ossermann E.F. and Lawlor D.P. (1966)
Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia.
J Exp Med 124:921-952

53. Panfilis G.De, Colli V., Manfredi G., Misk J., Rima S., Zampetti M. and Allegra F. (1979)
In situ identification of mononuclear cells infiltrating cutaneous carcinoma: on immunohistochemical study
Acta Derm Venereol (Stockh) 59:219-222

54. Papadimitriou C.S., Stein H. and Papacharalampous N.X. (1980)
Presence of alpha$_1$-antichymotrypsin and alpha$_1$-antitrypsin in haematopoietic and lymphoid tissue cells as revealed by the immunperoxidase method
Path Res Pract 169:287-297

55. Radaszkiewicz T. and Denk H. (1979)
Immunohistologic detection of immunoglobulins in malignant lymphomas and its value in histopathologic diagnosis
Virchows Arch (Pathol Anat) 381:141-158

56. Radaszkiewicz T. (1980)
Maligne und benigne Lymphome: Histologische Klassifikation und immunmorphologische Untersuchungen.
Ergebnisse von 838 Fällen.
Wien Klin Wochenschr Jg.92, 23:819-833

57. Rappaport H. (1966)
Tumors of the hematopoietic system
Atlas of tumor pathology, Sect. 3, Fasc. 8.
Washington D.C., AFIP,1966

58. Rüdiger K.-D., Wutke K., Kelényi G. (1979)
Morphologische und immunzytologische Klassifikation sekretorisches Immunglobulin produzierender maligner Lymphome.
Arch Geschwulstforsch 49/8:662-670

59. Schauenstein K. and Wick G. (1982)
Membrane immunfluorescence (4.4.2, 44-47)
in: Immunofluorescence Technology
Wick G., Traill K.N., Schauenstein K. (Hrsg)
Elsevier Biomedical Press 1982
Amsterdam - New York - Oxford

60. Seligmann M., Preud'Homme J.-L. and Brouet J.-C. (1973)
B and T cell markers in human proliferative blood diseases and primary immunodeficiencies, with special reference to membrane bound immunoglobulins.
Transplant Rev 16:85-113

61. Stein H. (1980)
Immunochemische und immunzytologische Befunde bei Non-Hodgkin-Lymphomen
in: Malignant lymphoproliferatie diseases, 167-181
J.G. van den Tweel et al. (Hrsg)
Martinus Nijhoff Publishers bv, Den Haag/Boston/London

62. Stein H. and Tolksdorf G. (1980)
Development and differentiation of the T-cell and B-cell systems: A perspective.
in: Malignant lymphoproliferative diseases, 13-29
J.G. van den Tweel et al. (Hrsg)
Martinus Nijhoff Publishers bv, Den Haag/Boston/London

63. Sternberger L.A. (1974)
The unlabeled antibody enzyme method in immuncyto-chemistry.
Prentice Hall, New Jersey

64. Sternberger L.A. and Cuculis I.I. (1969)
Method for enzymatic intensification of the immonocytochemical reaction without use of labeled antibodies (abstract).
J Histochem Cytochem 17:190

65. Sternberger L.A., Hardy P.H.Jr., Cuculis I.I. and Meyer H.G. (1970)
The unlabeled antibody method of immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem 18:315-333

66. Sternberger L.A. and Petrali I.P. (1977)
The unlabeled antibody enzyme method. Attempted use of peroxidase-conjugated antigen as the third layer in the technique.
J Histochem Cytochem 25:1036-1042

67. Stjernswärd J. and Levin A. (1971)
Delayed hypersensitivity induced regression of human neoplasms
Cancer 28:628-640

68. Taylor C.R. (1976)
An immunhistological study of follikular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease
Eur J Cancer 12:61-75

69. Taylor C.R. (1980)
Immunperoxidase techniques in lymphoma research.
In: Malignant lymphoproliferative diseases, 111-131
J.G. van den Tweel et al.(Hrsg)
Martinus Nijhoff Publishers bv, Den Haag/Boston/London

70. Taylor C.R. and Mason D.Y. (1974)
The immunohistological detection of intracellular immunoglobulin in formalin-paraffin sections from multiple myeloma and related conditions using the immunperoxidase technique
Clin Exp Immunol 18:417-429

71. Turesson I. (1976)
Distribution of immunoglobulin-containing cells in human bone marrow and lymphoid tissues.
Acta Med Scand 199:293-304

72. Valnes K. and Brandtzaeg P. (1981)
Unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase method combined with direct immunofluorescence.
J Histochem Cytochem 29:703-711

73. Vernon S., Voet R.L., Naeim F. and Waisman J. (1979)
Nodular lymphoma with intracellular immunoglobulin
Cancer 44:1273-1279

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. med. G. Burg gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und für die freundschaftliche Anteilnahme am Fortgang meiner Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Fr. E. Ebmeyer für die Einführung in die Methodik der Histochemie und für ihre hilfreichen technischen Ratschläge.

Den Mitarbeitern des histologischen Labors danke ich für die Anfertigung von Schnitten.

Lebenslauf

Am 09.02.1958 wurde ich als erstes Kind von Dr. med. Rolf Detmar und seiner Ehefrau Ruth, geb. Spielbusch, in Mindelheim geboren.

Von 1964 - 1968 besuchte ich die Volksschule in Bad Wörishofen und anschließend das Maristenkolleg in Mindelheim, wo ich nach neun Jahren auf dem neusprachlichen Gymnasium 1977 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Sommer 1979 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und im Sommer 1980 den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Meine Dissertation begann ich im Wintersemester 1980 bei Herrn Prof. Dr. med. G. Burg in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Im Frühjahr 1983 legte ich den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Im März 1983 heiratete ich Fräulein Claudia Perwein.

Mein praktisches Jahr besteht aus je einem Tertial Innere Medizin im Krankenhaus München-Schwabing, Chirurgie im Krankenhaus des Dritten Ordens in Nymphenburg und Dermatologie in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Im Frühjahr 1984 schloß ich mein Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Meine Approbation erhielt ich im Mai 1984.